



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

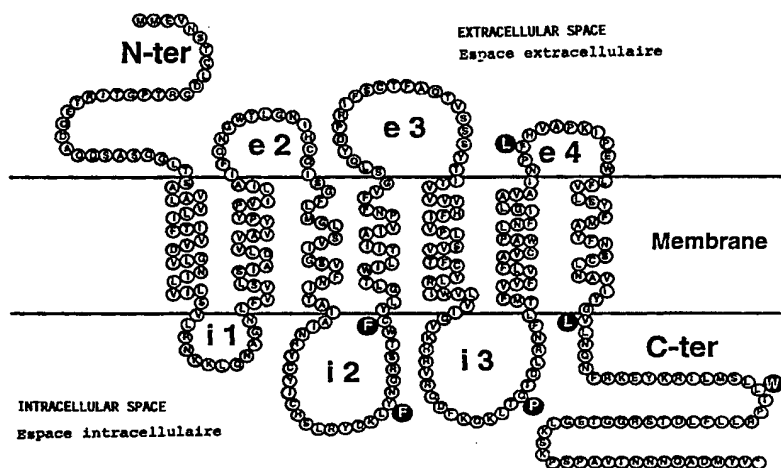
(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, C07K 14/72, C12Q 1/68, C12N 5/10		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/04094
			(43) Date de publication internationale: 6 février 1997 (06.02.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01167		(81) Etats désignés: AU, CA, CN, JP, NO, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 24 juillet 1996 (24.07.96)			
(30) Données relatives à la priorité: 95/08947 24 juillet 1995 (24.07.95) FR		Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): ADIR ET CIE [FR/FR]; 1, rue Carle-Hébert, F-92415 Courbevoie Cédex (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): JOCKERS, Ralf [DE/FR]; 24, rue Lazare-Hoche, F-91120 Palaiseau (FR). MARULLO, Stefano [IT/FR]; 3, place de l'Escadrille-Normandie-Niemen, F-75013 Paris (FR). STROSBURG, Arthur, Donny [BE/FR]; 66, rue de Javel, F-75015 Paris (FR).			
(74) Mandataire: CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).			

(54) Title: NUCLEIC SEQUENCES CODING FOR MELATONIN RECEPTORS, AND USES THEREOF

(54) Titre: SEQUENCES NUCLEIQUES CODANT POUR DES RECEPTEURS DE LA MELATONINE ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract

Nucleic sequences coding for MEL1 A-type clawed toad (*Xenopus*) melatonin receptors, also known as Mel_{1C}, oligonucleotides included in such sequences, the uses thereof as a probe and for expressing proteins and/or fragments thereof having functional MEL1 A-type melatonin receptor activity, vectors useful for said expression, cellular hosts containing said vectors, and a melatonin receptor study model, are disclosed. A method for screening substances that are agonists or antagonists of the proteins having melatonin receptor activity, and kits for detecting the degree of affinity of various substances for said proteins having melatonin receptor activity, are also disclosed. Said nucleic sequences coding for functional MEL1 A-type melatonin receptors are selected from the following sequences: SEQ ID No 1, SEQ ID No 3, SEQ ID No 5 and SEQ ID No 7.



COULET: GCA GAT ATG TAC GTG TAA ACA CAG CTT TCC ACC AAT ATG TAC TCT GTT TCA ACT ATG AAT ACA AGT TTC TTT TAT GGC AGT TGC ACC ATG TGC CTA ATT CTG
long GCA GAT ATG TAC GTG TAA ACA CAG CTT TCC ACC AAT ATG TAC TCT GTT TCA ACT ATG AAT ACA AGT TTC TTT TAT GGC AAA AAA AAA AAA AGAATTC
A G M Y V
long TCC ATT CAT TCT AAA ATT TTT GTA TAA ACA TAC ATT CTG TTG GTT GAC AAG AAC AAG CTT GCT TCT CTG CAG AAA AGA AAT ATT TTG AAT CTT GGC
long TGA TTT GTT ATT AAT AAC GAT AAA TGG AAT GTC TTA AAA AAA AAA AAGAAATTC

(57) Abrégé

Séquences nucléiques codant pour des récepteurs de la mélatonine de xénope de type MEL1 A, également dénommés Mel_{1c}, oligonucléotides compris dans lesdites séquences, leurs applications en tant que sonde et pour l'expression de protéines et/ou de fragments de celles-ci ayant une activité de récepteur fonctionnel de la mélatonine de type MEL1 A, vecteurs utiles pour ladite expression, hôtes cellulaires contenant lesdits vecteurs ainsi que modèle d'étude des récepteurs de la mélatonine. Procédé de criblage de substances, à action agoniste ou antagoniste vis-à-vis des protéines ayant une action de récepteur de la mélatonine et trousse ou kits pour la détection du degré d'affinité de différentes substances pour lesdites protéines à activité de récepteur de la mélatonine. Lesdites séquences nucléiques codant pour des récepteurs fonctionnels de la mélatonine de type MEL1 A, sont sélectionnées parmi les séquences suivantes: SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 5 ou SEQ ID N° 7.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

SEQUENCES NUCLEIQUES CODANT POUR DES RECEPTEURS DE LA MELATONINE ET LEURS APPLICATIONS

La présente invention est relative à des séquences nucléiques codant pour des récepteurs de la mélatonine de xénope de type MEL1 A, également dénom-
5 més ci-après Mel_{1c}, à des oligonucléotides compris dans lesdites séquences, à leurs applications en tant que sonde et pour l'expression de protéines et/ou de fragments de celles-ci ayant une activité de récepteur fonctionnel de la mélatonine de type MEL1 A, aux vecteurs utiles pour ladite expression, aux hôtes cellulaires contenant lesdits vec-
10 teurs ainsi qu'à un modèle d'étude des récepteurs de la mélatonine.

La présente invention est également relative à un procédé de criblage de substances, à action agoniste ou antagoniste vis-à-vis des protéines ayant une action de récepteur de la mélatonine et à des troussees ou kits pour la détection du degré d'affinité de différentes substances pour lesdites protéines à activité de récepteur de la mélatonine.

15 Un récepteur de la mélatonine de *Xenopus laevis* a été décrit (EBISAWA T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 6133-6137). Il s'agit d'une protéine de 420 aminoacides.

Toutefois, des amorces localisées dans la partie 3' des séquences nucléiques correspondantes n'ont pas permis d'amplifier la séquence codant pour cette
20 protéine.

C'est pourquoi la Demanderesse s'est donné pour but de rechercher des séquences nucléiques aptes à coder le récepteur de la mélatonine de type MEL1 A, lesquelles séquences étant aisément amplifiables dans leur intégralité.

La présente invention a pour objet des séquences nucléiques codant
25 pour des récepteurs fonctionnels de la mélatonine, de type MEL1 A et de structure différente de celle du récepteur décrit dans EBISAWA et al. et présentant des propriétés de couplage et de régulation différentes de celles du récepteur antérieurement décrit, lesquelles séquences sont sélectionnées parmi les séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7, telles que présentées dans la liste des séquences
30 incluse dans la présente Demande.

Ces séquences selon l'invention présentent, en 3' une séquence non codante plus ou moins longue (séquences longues : SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 5 ;

séquences courtes : SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 7), qui intervient de manière cruciale sur la régulation de l'ARN : $\frac{1}{2}$ vie de l'ARN, modifiée par rapport aux séquences de l'Art antérieur.

En particulier, les SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 3 codent pour une
5 protéine présentant 65 aminoacides en moins, par rapport à la séquence décrite dans l'Art antérieur, les 2 aminoacides en position C-terminale étant, en outre, différents. Cette protéine correspond au récepteur de la mélatonine dénommé MEL1 Aa ou Mel_{1 α (α)}.

Les SEQ ID N° 5 et SEQ ID N° 7 codent pour une protéine pré-
10 tant également 65 aminoacides en moins, par rapport à la séquence décrite dans l'Art antérieur ; en outre, 6 résidus d'aminoacides sont différents, par rapport à ladite séquence de l'Art antérieur. Cette protéine correspond au récepteur de la mélatonine dénommé MEL1 Ab ou Mel_{1 α (β)}.

Aussi bien la séquence codant pour le récepteur MEL1 Aa ou
15 Mel_{1 α (α)} que la séquence codant pour le récepteur MEL1 Ab ou Mel_{1 α (β)} pourraient entraîner des modifications dans la régulation de l'ARN, en rapport avec la séquence non codante en 3' (régulation par un ligand agoniste, durée de vie de l'ARN).

De manière inattendue, seul le récepteur MEL1 Aa ou Mel_{1 α (α)} inhibe
l'adénylyl cyclase ; en effet, le récepteur MEL1 Ab ou Mel_{1 α (β)} est dépourvu de cette
20 propriété à inhiber l'adénylyl cyclase.

En outre, d'autres signaux biologiques sont associés à ces protéines ; en particulier, ces deux isoformes alléliques sont capables de moduler le GMPc intracellulaire (modulation dose-dépendante) et notamment d'inhiber l'accumulation de GMPc induite par un inhibiteur de phosphodiesterase.

25 La présente invention a également pour objet les fragments desdites séquences, utiles soit pour une expression fonctionnelle du peptide correspondant au récepteur de la mélatonine correspondant, soit à la détection de la séquence codant pour ledit récepteur.

Parmi lesdits fragments, l'invention englobe, entre autres :

- une séquence constituée d'un segment de 230 paires de bases nucléotidiques, correspondant aux nucléotides 1057-1286 des SEQ ID N° 1 ou SEQ ID N°5 ;

5 - une séquence constituée d'un segment de 69 paires de bases nucléotidiques, correspondant aux nucléotides 1057-1125 des SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N°7.

La présente invention a également pour objet des sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles s'hybrident avec les séquences nucléotidiques telles que définies ci-dessus.

10 Des conditions d'hybridation convenables sont notamment les suivantes : l'hybridation est réalisée à 42°C dans un tampon comprenant : 4X SSC, 40 % de formamide, 0,2 % de SDS et tampon Denhardt 5X.

De telles sondes ont notamment l'avantage de permettre la caractérisation des différents variants du récepteur fonctionnel de la mélatonine de type
15 MEL1 A (MEL1 Aa ou MEL1 Ab).

La présente invention a également pour objet les protéines et/ou fragments de protéine, caractérisés en ce qu'ils sont codés par une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus et en ce qu'ils présentent une activité de récepteur de la mélatonine de type MEL1 fonctionnel.

20 Conformément à l'invention, ladite protéine est sélectionnée parmi l'une quelconque des séquences SEQ ID N°2 (la SEQ ID N°4 étant identique à la SEQ ID N°2) ou SEQ ID N°6 (la SEQ ID N°8 étant identique à la SEQ ID N°6), telles que présentées dans la liste de séquences incluse dans la présente Demande.

Les SEQ ID N° 2 et N° 4 correspondent au récepteur de la mélatonine dénommé MEL1 Aa ou Mel_{1α(α)} ; les SEQ ID N° 6 et N° 8 correspondent au
25 récepteur de la mélatonine dénommé MEL1 Ab ou Mel_{1α(β)}.

Ces deux protéines, dont la structure est différente de celle de la protéine de l'Art antérieur, présentent, de manière inattendue, des réactions et des signaux biologiques différents de ceux antérieurement décrits, notamment en ce qui
30 concerne le couplage aux protéines G (signalisation).

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique conforme à l'invention.

On entend au sens de la présente invention, par vecteur recombinant
5 aussi bien un plasmide, un cosmide qu'un phage.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit vecteur, il est constitué par un vecteur recombinant dans lequel est insérée une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, lequel vecteur est un vecteur d'expression d'une protéine ayant une activité de récepteur fonctionnel de la mélatonine de type MEL1 A, conforme à
10 l'invention.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit vecteur est constitué d'un plasmide pcDNA3 (Invitrogen), comprenant un promoteur RSV et la SEQ ID N° 1.

Un tel plasmide a été dénommé X-MEL1a et a été déposé sous le
15 n° I-1583 en date du 7 juin 1995 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit vecteur est constitué d'un plasmide pcDNA3 (Invitrogen), comprenant un promoteur RSV et la SEQ ID N° 5.

20 Un tel plasmide a été dénommé X-MEL1b et a été déposé sous le n° I-1584 en date du 7 juin 1995 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.

La présente invention a également pour objet une cellule hôte appropriée, obtenue par transformation génétique, caractérisée en ce qu'elle est transformée
25 par un vecteur d'expression conforme à l'invention.

Une telle cellule est capable d'exprimer une protéine, ayant une activité de récepteur fonctionnel de la mélatonine, de type MEL1 A.

Selon un mode de réalisation avantageux, la cellule hôte est notamment constituée par les cellules de la lignée L.

30 La présente invention a également pour objet un processus d'expression d'une protéine conforme à l'invention, caractérisé en ce que la cellule hôte, résultant de la transformation par un vecteur contenant une séquence nucléotidi-

que selon l'invention codant pour une protéine ayant une activité de récepteur fonctionnel de la mélatonine de type MEL1 A, est cultivée de manière à produire et à transporter ladite protéine exprimée vers la membrane, de telle sorte que les séquences transmembranaires dudit récepteur soient exposées à la surface de la membrane de l'hôte cellulaire transformé.

La présente invention a également pour objet un modèle d'étude des récepteurs de la mélatonine de type MEL1 A, caractérisé en ce qu'il est constitué par des cellules hôtes conformes à l'invention, c'est-à-dire exprimant un récepteur fonctionnel de la mélatonine de type MEL1 A à la surface de leur membrane cellulaire.

Un tel modèle permet l'étude, d'un point de vue pharmacologique, des récepteurs de la mélatonine, notamment en permettant l'identification des ligands spécifiques des récepteurs de type MEL1 A (agonistes et antagonistes) et ainsi la mise au point de médicaments actifs sur la régulation de l'horloge biologique, avec des applications particulièrement intéressantes, notamment dans le domaine cardiovasculaire (lipolyse) et en cancérologie (mise en phase des cellules).

L'invention a également pour objet un procédé de détection de la capacité d'une substance à se comporter comme ligand vis-à-vis d'une protéine conforme à l'invention, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de ladite substance avec une cellule hôte préalablement transformée par un vecteur d'expression conforme à l'invention, laquelle cellule hôte exprime ladite protéine (récepteur de la mélatonine), et laquelle mise en contact est réalisée dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre l'un au moins des sites spécifiques et ladite substance et

- la détection de la formation éventuelle d'un complexe de type ligand-protéine.

La présente invention a, de plus, pour objet un procédé pour l'étude de l'affinité d'une protéine conforme à l'invention pour un ou plusieurs ligands déterminés, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- la transformation d'une cellule hôte appropriée par un vecteur conforme à l'invention ;

- la culture de la cellule hôte transformée, dans des conditions permettant l'expression du récepteur de la mélatonine de type MEL1 A, codé par la

séquence nucléotidique, et le transfert du récepteur de la mélatonine exprimé vers la membrane de ladite cellule de sorte que les séquences transmembranaires du récepteur fonctionnel de la mélatonine soient exposées à la surface de la cellule hôte transformée ;

- 5 - la mise en contact de ladite cellule avec les ligands déterminés et
 - la détection d'une réaction affine entre ladite cellule transformée et lesdits ligands déterminés.

L'invention a, en outre, pour objet un kit pour la détection de l'affinité éventuelle d'un ligand pour une protéine conforme à l'invention, lequel kit est
10 caractérisé en ce qu'il comprend :

- une culture de cellules hôtes transformées par un vecteur d'expression conforme à l'invention ;
- éventuellement, si nécessaire, des moyens physiques ou chimiques pour induire l'expression d'une protéine (récepteur de la mélatonine de type MEL1 A),
15 codée par une séquence nucléotidique conforme à l'invention, contenue dans un vecteur dont le promoteur est inductible ;
- un ou plusieurs ligands témoins ayant des affinités déterminées pour ladite protéine ; et
- des moyens physiques ou chimiques pour la caractérisation de
20 l'activité biologique de la protéine exprimée.

De manière inattendue, les récepteurs de la mélatonine de type MEL1 A selon l'invention sont effectivement des récepteurs fonctionnels et permettent la réalisation de toutes les applications précitées.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore
25 d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention, avec référence aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 représente un schéma de la technique de clonage de l'ADNc du récepteur de la mélatonine, à partir de *Xenopus laevis* ;
30 - la figure 2 illustre les différents fragments de clonage utilisés ; la localisation des amorces sens (S) (→) et anti-sens (AS) (←) spécifiques de la séquence d'ADNc codant pour le récepteur de la mélatonine, antérieurement identifiée à partir

de mélanophores de derme de *Xenopus* ; la localisation des amorces qui ne correspondent pas à cette séquence (\Leftarrow) sont également illustrées à cette figure ;

- la figure 3 illustre les étapes de clonage et de séquençage des fragments d'ADNc du récepteur de la mélatonine ;

5 - la figure 4 correspond à une comparaison des séquences codant respectivement pour les récepteurs de la mélatonine Mel_{1c}(α) et Mel_{1c}(β) : la séquence du récepteur de la mélatonine Mel_{1c}(α) est illustrée (○) et les substitutions caractérisant le récepteur de la mélatonine Mel_{1c}(β) (●) sont indiquées à la figure 4A ; les séquences d'ADN de la région 3' non traduite longue et courte sont illustrées à la figure 4B. Les
10 récepteurs Mel_{1c}(α) sont préférentiellement associés à la région 3' non traduite courte (3 :1, court :long), alors que les récepteurs Mel_{1c}(β) sont préférentiellement associés à la région 3' non traduite longue (1 :3). A la figure 4B, les sites de clonage EcoRI sont soulignés.

- la figure 5 illustre la partie codante de séquence d'ADNc codant
15 pour le récepteur fonctionnel de la mélatonine de type MEL1 A (a ou b) en comparaison avec la séquence EBISAWA et al. (référence précitée) ;

- la figure 6 illustre la caractérisation des ADNs codant pour les récepteurs Mel_{1c}(α)/Mel_{1c}(β) chez différents types de *Xenopus*. L'amplification PCR utilisée dans ce test fournit le fragment 3 de la figure 2. Les enzymes de restriction utilisées pour la digestion des produits d'amplification PCR obtenus sont : Afl II (1 site à
20 la fois dans la séquence Mel_{1c}(α) et la séquence Mel_{1c}(β)), Bsp120 I (1 site dans la séquence Mel_{1c}(α), pas de site dans la séquence Mel_{1c}(β)), PmlI (1 site dans la séquence Mel_{1c}(β), pas de site dans la séquence Mel_{1c}(α)). L'analyse de restriction est effectuée à partir des produits PCR issus des ADN génomiques suivants : 1, *X. tropicalis* ; 2, *X. ruwenzoriensis* ; 3, individu *X. laevis* homozygote (ff) ; 4, ADNc de
25 Mel_{1c}(α) cloné ; 5, ADNc de Mel_{1c}(β) cloné ; 6, ADNc de *X. laevis* amplifié à partir d'un pool d'ARNm de peau ; 7, individu *X. laevis* hétérozygote (rf) ; ND, produit de PCR non digéré.

- la figure 7 illustre la spécificité pharmacologique de la liaison 2-(¹²⁵I)-iodomélatonine/récepteurs à la mélatonine, en présence de cellules L stables exprimant un récepteur selon l'invention (Mel_{1c(α)} ou Mel_{1c(β)}) ; la figure 7A montre l'isotherme de saturation de la liaison 2-(¹²⁵I)-iodomélatonine ; la liaison non-spécifique est mesurée en présence de mélatonine 10 μM ; cette figure 7A comprend en incrustation la représentation Scatchard des données. La figure 7B représente l'étude des liaisons par compétition de la 2-(¹²⁵I)-iodomélatonine (400pM) au récepteur, effectuées sur des membranes de cellules L, exprimant soit le récepteur Mel_{1c(α)}, soit le récepteur Mel_{1c(β)}, en présence d'I-mélatonine (Δ), de mélatonine (□), de N-acétyl-5-hydroxy-tryptamine (NAS) (○), de S22153(▲) et de S20098 (■).

- la figure 8 illustre la modulation de l'accumulation d'AMPC, stimulée par la forskoline, par les récepteurs Mel_{1c(α)} et Mel_{1c(β)}. Les clones stables de cellules L transfectées avec de l'ADNc codant soit pour le récepteur Mel_{1c(α)} (●), soit pour le récepteur Mel_{1c(β)} (○) sont stimulés par la forskoline (FK) (10 μM) en présence des concentrations indiquées de mélatonine (en abscisse) ; en ordonnée, cette figure comprend le taux d'AMPC intracellulaire en %. La valeur 100 % (□) correspond à la valeur moyenne d'AMPC en présence de forskoline 10 μM ; (■) indique la valeur d'AMPC, en présence de mélatonine (10 μM) seule (*P<0,05).

- la figure 9 illustre la modulation de l'accumulation d'AMPC stimulée par l'isoprotérénol, par les récepteurs de la mélatonine, dans des essais de transfection transitoire. Le récepteur Mel_{1c(α)} ou le récepteur Mel_{1c(β)} est co-exprimé avec le récepteur β2 adrénergique (β2-RA), en quantités égales dans des cellules L et stimulé avec de l'isoprotérénol (ISO, 10 μM), en présence ou en l'absence de mélatonine (Mel, 10 μM) : les taux d'AMPC sont mesurés ; NT signifie nontransfecté. Le nombre de sites de liaison spécifiques au ¹²⁵ICYP et à la 2-¹²⁵I-iodomélatonine [représentés comme suit : (sites de liaison spécifiques ICYP/sites de liaison spécifiques iodomélatonine) et exprimés en fmol/mg de protéine], dans ces cellules transfectées sont respectivement : NT (24/0) ; Mel_{1c(α)} (5/77) ; Mel_{1c(β)} (13/148) ; β2-RA (622/0) ; β2-RA/Mel_{1c(α)} (386/54), β2-RA/Mel_{1c(β)} (416/151) (*P<0,05).

- la figure 10 illustre la modulation de l'accumulation du GMPc par les récepteurs de la mélatonine. A la figure 10A, des cellules L transfectées de façon transitoire avec un ADNc codant soit pour le récepteur Mel_{1c}(α) (\square , \circ), soit pour le récepteur Mel_{1c}(β) (\blacksquare , \bullet), sont incubées avec les concentrations indiquées en abscisse de mélatonine, en présence (\circ , \bullet) ou en l'absence (\square , \blacksquare) de 1 mM d'IBMX. A la figure 10B, les cellules L transfectées de façon transitoire avec un ADNc codant soit pour le récepteur Mel_{1c}(α), soit le récepteur Mel_{1c}(β), sont préincubées soit dans un tampon, soit avec de la toxine de Pertussis (PTX, 100 ng/ml) pendant 18 heures, puis incubées en présence de 1 mM d'IBMX et en l'absence ou en présence de 10 μ M de mélatonine. Les taux de GMPc intracellulaires (en ordonnée) sont déterminés.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Isolement et identification des 4 séquences fonctionnelles du récepteur de la mélatonine de type MEL1 A.

a) Amplification de la partie codante du récepteur de la mélatonine de *Xenopus laevis*.

L'ARN total de la peau de *Xenopus laevis* est préalablement traité avec 0,3 U d'une DNase I sans RNase (RQ1 DNase, Promega) pendant 20 min à 37°C par mg d'acide nucléique. La synthèse de l'ADNc est réalisée par incubation de 200 ng d'ARN (chauffé à 65°C pendant 5 min avant la réaction) avec 100 unités de MMLV inverse transcriptase "StrataScript RNase H-" de Stratagène pendant 30 min à 37°C.

Après inactivation à 95°C (5 min), l'ADNc est amplifié par PCR avec différents couples d'oligonucléotides spécifiques du récepteur de la mélatonine de *Xenopus laevis*, de l'ADN polymérase Pwo (Boehringer Mannheim) avec son propre tampon, en présence de 2 mM de MgSO₄, dans un volume de 50 μ l. L'ADNc est dénaturé 2 min à 94°C, amplifié 40 fois ; une élongation de 3 min à 72°C est ensuite réalisée. Un cycle correspond à 15 sec. à 94°C ; 30 sec. à la température spécifique du couple d'oligonucléotide et 90 sec. à 72°C (GeneAmp PCR System 9600 de Perkin-Elmer Cetus). Les couples d'oligonucléotides mis en oeuvre pour amplifier différents

fragments de l'ADNc codant pour le récepteur de la mélatonine de *X. laevis* (figure 2) sont les suivants :

- fragment 1: 5'AGAAATGATGGAGGTGAATAGCA3' (SEQ ID N° 9) (3S, position 28) et 5'CGGCAATAGACAAACTGACAACA3' (SEQ ID N° 10) (3AS, position 241) (température spécifique d'hybridation de 54°C) ;

- fragment 2: 5'TATTGGTCATTTTGTCTGTC3' (SEQ ID N° 11) (5S, position 183) et 5'CCAGGTGCTTCTTTGATTAT3' (SEQ ID N° 12) (5AS, position 462) (température spécifique d'hybridation de 50°C) ;

- fragment 3 : 5'CTTCAACATAACAGCCATAGC3' (SEQ ID N° 13) (6S, position 391) et 5'TGCTTGATTGTTGTTGGTTAC3' (SEQ ID N° 14) (6AS, position 764) (température d'hybridation de 50°C) ;

b) Amplification de l'extrémité 3' du récepteur de la mélatonine du *Xenopus laevis*.

Le fragment 4, contenant la région 3' non traduite est amplifié en utilisant le kit AmpliFINDER™ RACE (Clontech) et les oligonucléotides suivants : 5'TATGGTGTGCTAAATCAAACTTCCGCAAGGAGTA3' (SEQ ID N° 15) et 5'TACTGATGTCCTTATTGACTCCAAGACTGTTGTTT3' (SEQ ID N° 16) (température d'hybridation de 58°C).

Par ailleurs, l'ADNc codant pour tout le récepteur de la mélatonine peut être amplifié avec les amorces suivantes : 5'AGAAATGATGGAGGTGAATAGCA3' (SEQ ID N° 17) (3S) et 5'TTAGAATGAATGGACAGAA3' (SEQ ID N° 18) (12AS) (température d'hybridation de 52°C).

Plusieurs amorces ont été testées pour leur capacité à amplifier l'ADNc du récepteur de la mélatonine (figure 2).

Plus de 80 % de l'ADNc désiré a été amplifié en utilisant 3 paires différentes d'amorces qui comprennent des séquences chevauchantes (fragments 1-3), qui correspondent à la région codant pour le fragment allant jusqu'à Ala 349.

Tous les efforts pour amplifier la dernière portion de région codante en 3' et la région 3' non codante n'ont pas abouti.

Cette partie restante de l'ADNc du récepteur de la mélatonine a été amplifiée à l'aide d'une réaction PCR modifiée, en utilisant le site de polyadénylation, à l'extrémité 3' de l'ADNc en tant qu'amorce (principe décrit à la figure 3).

Deux fragments d'amplification (estimés à 400 pb (fragment court) et 600 pb (fragment long), respectivement) ont été obtenus en utilisant cette approche. Le fragment court de 400 pb contient 250 bp non-codantes (3' court) et 150 pb codantes ; le fragment de 600 pb contient 450 pb non-codantes (3' long) et 150 bp codantes.

5 La digestion de ces fragments avec deux enzymes de restriction montrent le profil de restriction attendu.

Les produits d'amplification ont été clonés séparément dans un vecteur et caractérisés par digestion enzymatique et par séquençage par la méthode aux didésoxy (4-6 clones/fragment).

10 Le fragment 1 correspond à la séquence 28-241 : 3 clones ont été séquencés, qui sont identiques avec la séquence publiée (EBISAWA et al.).

Parmi les clones des fragments 2 et 3, certains sont identiques à la séquence publiée tandis que d'autres montrent des différences au niveau de la séquence nucléique.

15 Dans un variant du fragment 2, on observe deux substitutions nucléotidiques silencieuses (pas de modification de la séquence en aminoacides), tandis que les variants du fragment 3 contiennent 26 substitutions nucléotidiques silencieuses et 6 substitutions entraînant une modification de la séquence en aminoacides correspondante (voir figures 4 et 5).

20 A la fois les formes courtes et longues des fragments 4 présentent une forte homologie avec la séquence publiée du récepteur de la mélatonine jusqu'à la méthionine en position 353.

Pour ce qui concerne le fragment 4 court (voir SEQ ID N° 5 et N° 7) (fragment C), au-delà de la méthionine 353, deux aminoacides différents ont été détec-
25 tés, c'est-à-dire tyrosine à la place de leucine (position 354) et valine à la place de glycine (position 355), suivis par un codon stop, entraînant la perte de 65 aminoacides, si l'on compare avec la séquence publiée du récepteur de la mélatonine de *Xenopus laevis* (figure 4A).

L'alignement en aminoacides dudit récepteur, à partir de *Xenopus*, de
30 l'Homme et du mouton, montre que la séquence publiée du récepteur de la mélatonine à partir de *Xenopus* présente une queue C-terminale beaucoup plus longue que le récepteur des deux autres espèces (REPPERT et al., 1994).

Contrairement à la séquence publiée, le récepteur de la mélatonine selon l'invention obtenue à partir de *Xenopus laevis* présente la même taille que le récepteur de la mélatonine obtenu à partir de l'Homme ou du mouton.

Pour ce qui concerne le fragment 4 long (fragment L) (voir SEQ ID N° 1 et N° 3) : 4 clones ont été séquencés, l'un d'eux correspond à la séquence publiée jusqu'à la méthionine 353, 3 d'entre eux montrent le même changement que celui observé dans le fragment court, jusqu'à la méthionine 353. Dans tous les clones, les aminoacides 354 et 355 sont modifiés par rapport à la séquence publiée et présentent un codon stop en position 356, comme visible dans le fragment court.

En plus, la région non codante en 3' du fragment long est identique avec celle du segment court, jusqu'à la queue de polyadénylation ; il comprend, en outre, 160 pb, suivi par sa propre queue de polyadénylation (voir liste des séquences, SEQ ID N° 1 et N° 3) (voir figure 2).

Les différences de séquences retrouvées dans toute la séquence sont soulignées dans la figure 5.

De manière inattendue, le séquençage du récepteur de la mélatonine obtenu par PCR-RT révèle donc deux séquences différentes (MEL1 Aa et MEL1 Ab).

En outre, l'ADNc codant pour le récepteur complet de la mélatonine peut être amplifié à partir de l'ADN de peau de xénope, par PCR, utilisant les amorces 3S et 12AS, localisée dans la région 3' non-codante (voir figure 2).

L'analyse de restriction de plusieurs clones confirme que 2 ARNm différents pour le récepteur de la mélatonine sont effectivement présents dans les échantillons analysés.

Les 2 ARNm codent pour des protéines de 354 aminoacides qui sont très similaires au récepteur Mel_{1c} de poulet (78 % d'homologie).

Le fragment C (fragment court) a en conséquence également été dénommé Mel_{1c}(α) et le fragment L (fragment long) (comprenant de nombreuses substitutions) a été dénommé Mel_{1c}(β).

EXEMPLE 2 : Construction d'un vecteur pour l'expression du récepteur fonctionnel de la mélatonine de type MEL1 A.

Le récepteur de la mélatonine de *Xenopus laevis* a été cloné conformément à la méthode RT-PCR (voir figure 1).

5 L'ARN est isolé de la peau de *Xenopus* et transcrit en ADNc à l'aide de la transcriptase inverse.

Une amplification sélective de l'ADNc du récepteur de la mélatonine est réalisée en utilisant des amorces PCR spécifiques de ce récepteur.

10 Le récepteur amplifié est cloné dans le vecteur d'expression pcDNA3-RSV dérivé du plasmide pcDNA3 (Invitrogen) et son identité a été vérifiée par séquençage, comme suit :

Des préligations successives des fragments entre eux, grâce à des enzymes de restriction communes deux à deux, a permis d'insérer la totalité du récepteur de la mélatonine dans le plasmide pcDNA3/RSV aux sites HindIII/ Bsp120I à bout franc, sous le contrôle du promoteur du *rous sarcoma virus* (RSV). Les fragments 2 et 3 sont tout d'abord liés au niveau du site enzymatique commun "HindIII", en position 455 de la séquence codante. Ce dernier est ensuite lié avec le fragment 1 au site commun "Bsu36I" en position 202 et avec le fragment 4 au site commun "XbaI" en position 1016. Chaque fragment est préalablement coupé par les deux enzymes indispensables pour les ligations successives. Ce fragment purifié, composé des fragments 1, 2, 3 et 4 dont les extrémités 5' et 3' sont respectivement HindIII et EcoRI à bout franc, est enfin inséré dans pcDNA3/RSV.

EXEMPLE 3 : Caractérisation du locus Mel_{1c} dans plusieurs espèces de xénopes.

25 Les récepteurs Mel_{1c(α)} (ou Mel1 Aa) et Mel_{1c(β)} (ou Mel1 Ab) hautement homologues peuvent représenter soit 2 allèles différents au niveau du même locus génomique, soit 2 isoformes codées par différents gènes.

Pour pouvoir répondre à cette question, le fragment 3 codant pour les récepteurs Mel_{1c} (ou Mel1 A) ont été amplifiés par PCR, à partir d'ADN génomique de 43 *Xenopus laevis*.

30 Plusieurs de ces animaux sont des animaux consanguins, tandis que d'autres sont des animaux sauvages importés d'Afrique du Sud.

Les fragments d'ADN amplifiés de la taille attendue sont digérés avec des enzymes de restriction convenable spécifiques des ADNc Mel_{1c(α)} ou Mel_{1c(β)} (figure 6).

Chez un individu *X. laevis* (ff), homozygote pour le complexe majeur
5 d'histocompatibilité et d'autres marqueurs génétiques, seul le gène codant pour le récepteur Mel_{1c(α)} est trouvé.

L'analyse PCR d'une seconde grenouille *X. laevis* (rf), connue pour être hétérozygote pour les marqueurs génétiques mentionnés ci-dessus, révèle la présence des 2 gènes (gène codant pour le récepteur Mel_{1c(α)} et gène codant pour le
10 récepteur Mel_{1c(β)}) (figure 6).

Cette observation confirme l'hypothèse selon laquelle les 2 isoformes du récepteur de la mélatonine sont codées par le même locus génomique. L'analyse des 41 autres animaux montre la présence soit des 2 gènes (40 individus) soit du gène Mel_{1c(α)} seul (1 individu). Aucun animal ne présente que le gène du récepteur Mel_{1c(β)}.

15 Deux autres espèces de *Xenopus* ont été étudiées selon la même approche.

L'analyse de l'ADN génomique de *X. ruwenzoriensis*, une espèce connue pour être polyploïde, révèle la présence du gène codant pour le récepteur Mel_{1c(α)}. Deux gènes codant pour le récepteur de la mélatonine clairement différents de
20 Mel_{1c(α)} et Mel_{1c(β)} ont été révélés par la comparaison des profils de digestion enzymatique de *X. tropicalis* et *X. ruwenzoriensis* (figure 6).

EXEMPLE 4 : Pharmacologie du récepteur fonctionnel de la mélatonine de type MEL1 A.

a) Expression stable

25 Le vecteur pcDNA3-RSV contenant la région codante et la région non-codante 3' du récepteur de la mélatonine du *Xenopus laevis* selon l'exemple 2, est transfecté dans les cellules L de souris.

La veille, 3x10⁵ cellules sont passées dans les flasks de 25 cm² dans un milieu DMEM 4,5 g/l de glucose; 1 mM glutamax; 1 mM pyruvate; 10 % FCS
30 (DMEM/FCS). Le jour de la transfection, le milieu est changé (6 ml de

DMEM/FCS/flask) et les cellules sont incubées pendant 3 heures à 37°C. Parallèlement une coprécipitation de l'ADN et du CaPO_4 est préparée de la manière suivante : dans un volume final de 500 μl , on mélange 30 μg d'ADN *carrier* (pGEM3Z de Promega), 2 μg du vecteur pcDNA3-RSV contenant la région codante et la région non-codante 3'

5 du récepteur de la mélatonine du *Xenopus laevis* et du CaCl_2 (250 mM final)(Solution A). 450 μl de cette Solution A sont rajoutés goutte à goutte, en vortexant, à 450 μl de HBS 2x (1,64 g NaCl; 1,19 g Hepes; 0,04 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ additionnés à 100 ml H_2O) et le pH est ajusté à 7,12. Le mélange est laissé sans agitation à température ambiante pendant 45 min. 400 μl du coprécipité sont ajoutés dans une flask contenant

10 les cellules L. Après 4 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont lavées une fois avec 6 ml de DMEM et ensuite incubées 2 min dans 4 ml de glycérol à 15%. Ensuite les cellules sont lavées deux fois avec du DMEM et laissées dans 6 ml de DMEM/FCS, supplémenté avec 5 mM de nabutyrate à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, le milieu est retiré, les cellules sont de nouveau lavées au DMEM/FCS puis incubées pen-

15 dant une nuit dans du DMEM/FCS. Le troisième jour les cellules sont distribuées dans des plaques de 96 puits à différentes dilutions (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) dans un milieu DMEM supplémenté avec : du FBS à 10 % (v/v), 4,5 g/l de glucose, 100 U/ml de pénicilline, 100 mg/ml de streptomycine, 1 mM de glutamine et 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418 (généticine de Gibco Life Technologies). Des clones résistants à la généticine sont

20 testés pour l'expression du récepteur de la mélatonine par liaison avec la (125)Iodo-mélatonine (200 pM) dans un volume final de 250 μl (tampon: 50 mM Tris/HCl pH 7,4 ; 5 mM MgCl_2). La liaison non-spécifique est déterminée en présence de 10 mM de mélatonine.

b) Expression transitoire

25 Pour l'obtention d'une expression transitoire, les cellules L sont étalées soit sur des plaques comportant 6 puits (pour les tests AMPc, $0,5 \cdot 10^6$ cellules/puits), soit dans des boîtes de 10 cm de diamètre (tests GMPc, $2 \cdot 10^6$ cellules/boîte) et transfectées par la méthode au DEAE-dextran (LOPOTA et al., N.A.R., 1984, 12, 5707-5717), le jour suivant.

Après un lavage avec du PBS, du DMEM sans sérum, contenant de l'Hepès 50 mM, du DEAE-dextran à 200 µg/ml et 1 µg/ml d'ADN plasmidique plasmide pcDNA3-RSV), est ajouté.

Après incubation pendant 8 h à 37°C, le milieu est remplacé par du DMSO à 10 % dans du DMEM sans sérum pendant 1,5 min. Les cellules sont lavées avec du PBS et incubées dans un milieu DMEM contenant du sérum de veau foetal à 10 %. Les essais sont réalisés trois jours après la transfection.

a. Test de liaison du radioligand.

* Méthode

Les monocouches de cellules sous-confluentes sont lavées avec du PBS, incubées pendant 5 min à 37°C avec de la trypsine à 20 %, de l'EDTA 2 mM et remises en suspension dans du DMEM supplémenté avec du sérum de boeuf foetal à 10 % (v/v).

Après centrifugation à 450 x g pendant 5 min à 4°C, les culots cellulaires sont remis en suspension dans du PBS pH 7,4.

Les suspensions cellulaires sont incubées avec 400 pM de 2-(¹²⁵I)-iodomélatonine (pour les essais de liaison sur les récepteurs à la mélatonine) ou 200 pM (¹²⁵I)-CYP (pour les tests de liaison aux récepteurs adrénergiques β2) en l'absence ou en présence de 10 µM de ligands froids (mélatonine ou D/L-propranolol, respectivement).

Les tests de liaison sont effectués dans les conditions suivantes :

60 min à 25°C dans un volume réactionnel final de 0,25 ml. Les réactions sont arrêtées à l'aide d'une filtration rapide à travers un filtre de fibre en verre Whatman GF/C, préalablement trempé pendant 30 min dans un tampon PBS contenant 0,3 % de polyéthylène imine (pour réduire les liaisons non-spécifiques).

Les concentrations en protéines sont mesurées sur les homogénats de cellules par la méthode de Bradford (Analytical Biochem., 1976, 72, 248-254), en utilisant le système d'essai des protéines Bio-Rad. La sérum albumine bovine est utilisée comme standard.

* Résultats

Parmi les différents clones exprimant les sites de liaison à la (125 I)-iodomélatonine, un clone Mel_{1c}(α) exprimant 200 fmol de récepteur/mg de protéines totales et un clone Mel_{1c}(β) exprimant 150 fmol de récepteur/mg de protéines totales ont été plus particulièrement caractérisés.

Les constantes de dissociation K_D de l'agoniste radiomarqué 2-(125 I)-iodomélatonine sont de 160 ± 32 et 143 ± 25 pM respectivement (figure 7A), valeurs qui sont en accord avec celles déterminées pour d'autres récepteurs de la mélatonine de forte affinité, y compris ceux antérieurement clonés, à partir de mélanophores de *X. laevis*. Les expériences de compétition ont montré que l'affinité vis-à-vis de différents ligands est caractéristique des récepteurs de la mélatonine (figure 7B et Tableau I).

Tableau I

Ligand	K _i (nM)		
	Mel _{1c} (α)	Mel _{1c} (β)	<i>Xenopus</i> (Ebisawa et al.)
Mélatonine-I	0,26 \pm 0,25	0,24 \pm 0,11	0,11
S20098	0,66 \pm 0,10	0,41 \pm 0,14	
Mélatonine	1,28 \pm 0,12	2,10 \pm 0,56	1,30
6-OH-mélatonine	35,70 \pm 4,04	46,90 \pm 1,88	20,00
S22153	195,00 \pm 6,64	359,00 \pm 140	
NAS	1425,00 \pm 327	1771,00 \pm 670	2000,00

Aucune différence significative n'est trouvée entre les récepteurs Mel_{1c}(α) et Mel_{1c}(β) dans les tests de liaison.

b. Détermination des taux intracellulaires d'AMP cyclique.

* Méthode

Les cellules mises en croissance dans des plaques contenant 6 puits sont lavées 2 fois avec du DMEM sans sérum, préincubées pendant 15 min à 37°C, puis incubées pendant 15 min à 37°C dans un milieu DMEM contenant 1 mM d'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine) avec ou sans isoprotérénol (10 μ M) (essais sur les cellules transfectées transitoires), ou 10 μ M de forskoline (essais sur les clones cellulaires stables) et des quantités croissantes de mélatonine.

Le tampon d'incubation est éliminé et les cellules sont lysées dans de la soude 1 M pendant 20 min à 37°C. Après neutralisation du pH avec de l'acide acétique 1 M, les lysats cellulaires sont centrifugés dans une microcentrifugeuse à 17 000 x g pendant 5 min. Les surnageants sont testés pour leur contenu en AMP cyclique à l'aide du système AMP cyclique ^3H (Amersham). Alternativement, les tests de mesure de l'AMP cyclique peuvent être réalisés dans des plaques contenant 24 puits ($0,5 \times 10^6$ cellules dans 300 μl). Les cellules sont alors incubées pendant 15 min et la réaction est stoppée par l'addition de 100 μl d'acide trichloracétique à 20 % et les surnageants sont testés pour leur contenu en AMP cyclique.

10 * Résultats

- Les récepteurs de la mélatonine, présentant une forte affinité, sont connus pour participer à l'inhibition de l'activité de l'adénylyl cyclase.

Dans les cellules L exprimant le récepteur $\text{Mel}_{1c(\alpha)}$, la mélatonine entraîne l'inhibition de l'accumulation de l'AMPc stimulée par la forskoline (figure 8).

15 La valeur IC_{50} de cet effet est d'environ 6.10^{-10}M , ce qui est en accord avec les valeurs obtenues précédemment avec les récepteurs de la mélatonine présentant une forte affinité.

De manière surprenante, dans les cellules exprimant le récepteur $\text{Mel}_{1c(\beta)}$, un tel effet ne peut pas être observé même à des concentrations en mélatonine supérieures à 0,1 mM.

Toutefois, les taux de base d'AMPc ne sont affectés par la mélatonine dans aucune des lignées cellulaires étudiées, même en présence d'IBMX.

L'inhibition de l'accumulation d'AMPc par les récepteurs de la mélatonine est couplée aux protéines G_i , par l'intermédiaire de leurs sous-unités α .

25 - Afin de vérifier que le signal produit avec le récepteur $\text{Mel}_{1c(\beta)}$ n'est pas dû à un changement quantitatif des sous-unités $G_{i\alpha}$, des cellules L contrôles et des clones exprimant soit les récepteurs $\text{Mel}_{1c(\alpha)}$ ou $\text{Mel}_{1c(\beta)}$ sont comparés pour ce qui concerne leur contenu en sous-unités $G_{i\alpha}$, conformément au protocole suivant :

Les cellules sont solubilisées dans un tampon Laemmli contenant 2 % de SDS et 40 mM de dithiothréitol et soniqué à 4°C. Après centrifugation dans une

microcentrifugeuse à 17 000 x g, 50 µl de surnageant est séparé en ses composants dans un gel SDS/polyacrylamide à 12 %. L'analyse des immunoblots est réalisée comme décrit dans SELZER E. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 1609-1613), avec 84 antisérums qui correspondent aux 3 sous-types de $G_{i\alpha}$.

5 L'analyse en Western blot avec un anticorps spécifique reconnaissant les 3 sous-types de $G_{i\alpha}$, ne permet pas de détecter de différences quantitatives significatives.

- Etude du signal de transduction (signalisation)

Il a été étudié après transfection transitoire des 2 isoformes d'ADNc
10 de Mel_{1c} dans des cellules L de manière à exclure un artefact potentiel associé à la sélection des clones. Les cellules L sont co-transfectées avec l'ADNc du récepteur adrénergique $\beta 2$ humain et avec soit l'ADNc du récepteur $Mel_{1c(\alpha)}$ ou du récepteur $Mel_{1c(\beta)}$; la co-expression de ces différents récepteurs permet d'étudier sélectivement la sous-population de cellules qui a effectivement internalisé l'ADN exogène.

15 Trois jours après la transfection, les cellules sont étudiées pour leur inhibition de l'accumulation d'AMP cyclique-mélatonine dépendante, en réponse à l'isoprotérénol, agoniste $\beta 2$ -RA et pour le nombre de sites de liaison β adrénergique et mélatonine (figure 9).

Aucun site de liaison, pour aucun des récepteurs, ne peut être mesuré
20 dans les cellules contrôles sauvages. Dans les cellules transfectées avec l'ADNc de récepteur adrénergique $\beta 2$ seul, l'incubation avec de l'isoprotérénol entraîne une augmentation d'un facteur 5 de l'AMPc. Dans les cellules co-transfectées avec des quantités identiques (1 µg d'ADN plasmidique) d'ADNc codant pour les récepteurs $Mel_{1c(\alpha)}$ et adrénergique $\beta 2$, l'incubation simultanée avec de l'isoprotérénol et de la mélatonine
25 entraîne une diminution significative de l'accumulation d'AMPc (65 ± 5 % du contrôle, $p < 0,05$) (figure 9).

Dans les mêmes conditions, les récepteurs $Mel_{1c(\beta)}$ ne sont pas capables d'inhiber l'accumulation d'AMPc induite par l'isoprotérénol, malgré l'expression d'un nombre équivalent de site de liaison aux récepteurs.

Des résultats similaires sont obtenus, lorsque l'ADNc codant pour le récepteur Mel_{1c(β)} est en excès d'un facteur 10 par rapport à l'ADNc codant pour le récepteur adrénergique β2.

Les récepteurs Mel_{1c(α)} inhibent l'accumulation d'AMPc stimulée par la forskoline de manière dose-dépendante avec une valeur IC₅₀ d'environ 6.10⁻¹⁰ M, une valeur en accord avec celle rapportée pour les récepteurs de la mélatonine précédemment décrite.

En contraste avec ces résultats, la liaison de la mélatonine aux récepteurs Mel_{1c(β)} ne stimule aucune modulation des taux d'AMPc bien que la forskoline stimule une accumulation d'AMPc similaire dans les lignées cellulaires exprimant soit les récepteurs Mel_{1c(α)}, soit les récepteurs Mel_{1c(β)}.

L'inhibition de la fonction adénylyl cyclase est principalement couplée aux protéines G_i activées.

L'analyse en Western blot montre la présence de quantités similaires de sous-unités α G_{i1-3} à la fois dans les 2 lignées cellulaires transfectées et dans les cellules L non transfectées contrôles, excluant la sélection potentielle de clones cellulaires exprimant des quantités peu importantes de protéines G_i. De plus, l'absence de modulation d'AMPc est également observée dans les essais de transfection transitoire, confirmant que le récepteur Mel_{1c(β)} lui-même est incapable d'activer cette voie biologique.

La différence entre les récepteurs Mel_{1c(α)} et Mel_{1c(β)}, à savoir essentiellement la substitution de 5 aminoacides, localisée dans les domaines intracellulaires, constitue la base moléculaire de ce phénomène ; dans les récepteurs appartenant à la famille des récepteurs incluant 7 domaines transmembranaires, ces régions intracellulaires sont connues pour être impliquées dans le couplage à la protéine G. Dans des conditions expérimentales appropriées, la mélatonine peut stimuler l'accumulation d'AMPc dans des cellules exprimant l'adénylyl cyclase de type II. Un tel effet n'est pas observable avec les clones stables exprimant le récepteur Mel_{1c(α)} ou le récepteur

Mel_{1c}(β), ni dans les cellules L transfectées de manière transitoire avec les ADNc correspondants.

c. Détermination des taux intracellulaires de GMP cyclique.

* Méthode

5 Les cellules transfectées transitoirement, mises en croissance dans des boîtes ayant un diamètre de 10 cm, sont incubées à 37°C pendant 15 min dans un milieu DMEM sans sérum, en présence ou en l'absence de 1 mM d'IBMX et de quantités croissantes de mélatonine. Le milieu est ensuite remplacé par 1 ml d'éthanol à 65 % glacé et les extraits cellulaires sont centrifugés à 2 000 x g pendant 15 min à 4°C. Les
10 surnageants sont séchés ; les culots sont remis en suspension dans 250 μ l d'un tampon acétylé.

Le GMP cyclique est dosé conformément au kit EIA (Amersham).

Des voies additionnelles telles que la modulation du contenu en GMPc a été proposée pour le récepteur de la mélatonine (VANECEK J. et al., Brain
15 Res., 1989, 505, 157-159).

Les cellules L exprimant soit les récepteurs Mel_{1c}(α), soit les récepteurs Mel_{1c}(β), sont incubées avec de la mélatonine et les effets sur le GMPc intracellulaire sont analysés. La mélatonine (jusqu'à 10 μ M) n'a aucun effet sur les taux de base de GMPc dans aucune des lignées cellulaires.

20 Le contenu intracellulaire en GMPc dépend de l'activité opposée des guanylyl cyclases, qui synthétisent le GMPc et des phosphodiésterases (PDE), qui dégradent le GMPc.

L'inhibiteur de PDE, IBMX lorsqu'il est ajouté au milieu, bloque la dégradation du GMPc par le PDE. Dans ces conditions, le taux de GMPc augmente
25 d'un facteur 3, indiquant la présence d'une activité PDE basale dans les cellules L non stimulées.

L'incubation avec de la mélatonine inhibe l'accumulation de GMPc stimulée par le PDE, de manière dose-dépendante dans des cellules L exprimant soit le récepteur Mel_{1c}(α), soit le récepteur Mel_{1c}(β) (figure 10A).

La valeur IC_{50} de cet effet (environ 10^{-9} M) correspond aux valeurs de K_i de la mélatonine obtenues dans les essais de compétition et est proche de la valeur IC_{50} obtenue lors de l'inhibition de l'adénylyl cyclase par le récepteur $Mel_{1c(\alpha)}$.

La stimulation par la mélatonine des cellules témoins n'affecte pas
5 l'augmentation de production de GMPc par IBMX.

La toxine de Pertussis, qui catalyse la ribosylation inactivante d'ADP des sous-unités α $G_{i/o}$ de protéines G, bloque l'inhibition de l'accumulation d'AMPc liée à la protéine G_i et stimulée par les récepteurs à la mélatonine. La préincubation de cellules avec la toxine de Pertussis abolit complètement l'effet de la mélatonine sur
10 l'accumulation de GMPc, suggérant que cette voie est également dépendante de la protéine $G_{i/o}$.

Les 2 ADNc de récepteurs de la mélatonine $Mel_{1c(\alpha)}$ et $Mel_{1c(\beta)}$ se trouvent soit sous forme longue, soit sous forme courte. L'ADNc du récepteur $Mel_{1c(\alpha)}$ se présente pour la plupart sous la forme courte (3:1, court:long), alors que
15 l'ADNc du récepteur $Mel_{1c(\beta)}$ est plus abondant sous la forme longue (1:3). Les régions non-traduites en 3' de plusieurs récepteurs de la même famille, tels que le récepteur adrénergique β_2 ou le récepteur muscarinique contiennent des déterminants moléculaires impliqués dans la régulation de la stabilité de l'ARNm. Ceci suggère que les ARNm courts et longs codant pour les récepteurs $Mel_{1c(\alpha)}$ et $Mel_{1c(\beta)}$ sont soumis à
20 des régulations différentes.

Dans la mesure où les isoformes du récepteur ont des affinités similaires pour la mélatonine mais des signaux biologiques différents, une telle régulation pourrait moduler la réponse cellulaire à la stimulation par la mélatonine.

Le rôle du GMPc comme second messenger dans la voie biologique
25 du récepteur à la mélatonine est encore controversé. L'agrégation pigmentaire dans les mélanocytes de *Xenopus* sont régulés par la mélatonine et par l'AMPc alors que des résultats contradictoires existent en ce qui concerne sa régulation par le GMPc. Le rôle du GMPc dans la stimulation de signaux biologiques liés à la mélatonine dans d'autres systèmes cellulaires n'a pas été approfondie. Un second argument en faveur de la
30 modulation du GMPc par les récepteurs à la mélatonine ressort des essais réalisés sur le

tissu d'hypophyse de rat néonatal dans lequel un effet inhibiteur de la mélatonine sur la production de GMPc est observé. Dans les essais tels que rapportés ci-dessus, les récepteurs Mel_{1c(α)} et Mel_{1c(β)} activés par la mélatonine inhibent effectivement l'accumulation de GMPc d'une manière dose-dépendante avec une valeur d'IC₅₀ d'environ 10⁻⁹ M. Cette inhibition n'est évidente que lorsque l'inhibiteur du PDE IBMX est inclut dans le milieu d'incubation, sans doute en raison d'une activité basale PDE importante dans les cellules L.

Les données rapportées ci-dessus confirment que les récepteurs de la mélatonine à haute affinité peuvent moduler le GMPc à concentration physiologique de mélatonine et montrent que les récepteurs Mel_{1c(β)} sont fonctionnels en terme de transduction du signal.

L'effet des récepteurs sur le GMPc est complètement aboli par la toxine de Pertussis, indiquant que les protéines G_{i/o} sont impliquées dans la transduction de ce signal.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES

(i) DEPOSANT:

(A) NOM: ADIR et CIE
(B) RUE: 1 rue Carle Hebert
(C) VILLE: COURBEVOIE
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 92415 CEDEX

(A) NOM: JOCKERS Ralf
(B) RUE: 24 rue Lazare Hoche
(C) VILLE: PALAISEAU
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 91120

(A) NOM: MARULLO Stefano
(B) RUE: 3 Place de l'escadrille Normandie Niemen
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75013

(A) NOM: STROSBERG Arthur Donny
(B) RUE: 66 rue de Javel
(C) VILLE: PARIS
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 75015

(ii) TITRE DE L' INVENTION: SEQUENCES NUCLEIQUES CODANT POUR DES
RECEPTEURS DE LA MELATONINE ET LEURS APPLICATIONS.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 18

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

(A) NUMERO DE LA DEMANDE: FR 95 08947
(B) DATE DE DEPOT: 24-JUL-1995

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1311 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS
(B) EMBLACEMENT: 1..1065

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATG	ATG	GAG	GTG	AAT	AGC	ACT	TGC	TTG	GAT	TGC	AGG	ACA	CCT	GGT	ACC	48
Met	Met	Glu	Val	Asn	Ser	Thr	Cys	Leu	Asp	Cys	Arg	Thr	Pro	Gly	Thr	
1				5					10					15		
ATA	CGA	ACA	GAG	CAG	GAT	GCA	CAG	GAC	AGC	GCA	TCT	CAG	GGA	CTC	ACC	96
Ile	Arg	Thr	Glu	Gln	Asp	Ala	Gln	Asp	Ser	Ala	Ser	Gln	Gly	Leu	Thr	
			20					25					30			
TCT	GCC	CTG	GCG	GTG	GTT	CTT	ATA	TTC	ACC	ATT	GTT	GTG	GAT	GTC	CTG	144
Ser	Ala	Leu	Ala	Val	Val	Leu	Ile	Phe	Thr	Ile	Val	Val	Asp	Val	Leu	
			35				40					45				
GGC	AAT	ATA	TTG	GTC	ATT	TTG	TCT	GTC	CTG	AGG	AAC	AAG	AAG	CTG	CAG	192
Gly	Asn	Ile	Leu	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Leu	Arg	Asn	Lys	Lys	Leu	Gln	
	50					55					60					
AAT	GCT	GGA	AAT	CTC	TTT	GTT	GTC	AGT	TTG	TCT	ATT	GCC	GAT	CTG	GTT	240
Asn	Ala	Gly	Asn	Leu	Phe	Val	Val	Ser	Leu	Ser	Ile	Ala	Asp	Leu	Val	
65					70				75					80		
GTT	GCT	GTG	TAT	CCC	TAT	CCG	GTA	ATT	CTC	ATA	GCT	ATT	TTC	CAG	AAT	288
Val	Ala	Val	Tyr	Pro	Tyr	Pro	Val	Ile	Leu	Ile	Ala	Ile	Phe	Gln	Asn	
				85					90					95		
GGG	TGG	ACG	CTT	GGA	AAT	ATC	CAT	TGT	CAG	ATC	AGT	GGC	TTC	CTG	ATG	336
Gly	Trp	Thr	Leu	Gly	Asn	Ile	His	Cys	Gln	Ile	Ser	Gly	Phe	Leu	Met	
			100					105					110			
GGA	CTC	AGC	GTT	ATT	GGA	TCA	GTC	TTC	AAC	ATA	ACA	GCC	ATA	GCT	ATC	384
Gly	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Ser	Val	Phe	Asn	Ile	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile	
			115				120					125				
AAC	AGG	TAT	TGC	TAC	ATC	TGC	CAC	AGC	CTG	AGA	TAT	GAC	AAG	CTT	TAT	432
Asn	Arg	Tyr	Cys	Tyr	Ile	Cys	His	Ser	Leu	Arg	Tyr	Asp	Lys	Leu	Tyr	
	130					135					140					
AAT	CAA	AGA	AGC	ACC	TGG	TGC	TAC	CTT	GGC	CTG	ACA	TGG	ATA	CTA	ACT	480
Asn	Gln	Arg	Ser	Thr	Trp	Cys	Tyr	Leu	Gly	Leu	Thr	Trp	Ile	Leu	Thr	
145					150				155					160		
ATA	ATT	GCA	ATC	GTG	CCA	AAC	TTT	TTT	GTT	GGA	TCA	CTA	CAG	TAT	GAC	528
Ile	Ile	Ala	Ile	Val	Pro	Asn	Phe	Phe	Val	Gly	Ser	Leu	Gln	Tyr	Asp	
				165					170					175		
CCC	AGG	ATT	TTT	TCT	TGC	ACA	TTT	GCG	CAG	ACA	GTG	AGT	TCC	TCA	TAC	576
Pro	Arg	Ile	Phe	Ser	Cys	Thr	Phe	Ala	Gln	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	
			180					185					190			
ACC	ATA	ACA	GTA	GTG	GTG	GTG	CAT	TTT	ATA	GTC	CCT	CTT	AGT	GTT	GTG	624
Thr	Ile	Thr	Val	Val	Val	Val	His	Phe	Ile	Val	Pro	Leu	Ser	Val	Val	
			195				200					205				
ACA	TTC	TGT	TAC	TTA	AGA	ATA	TGG	GTT	TTA	GTG	ATC	CAA	GTC	AAA	CAC	672
Thr	Phe	Cys	Tyr	Leu	Arg	Ile	Trp	Val	Leu	Val	Ile	Gln	Val	Lys	His	
	210					215				220						
AGA	GTT	AGA	CAA	GAC	TTC	AAG	CAA	AAG	TTG	ACA	CAA	ACA	GAC	TTG	AGA	720
Arg	Val	Arg	Gln	Asp	Phe	Lys	Gln	Lys	Leu	Thr	Gln	Thr	Asp	Leu	Arg	
225					230				235					240		
AAT	TTC	TTG	ACC	ATG	TTT	GTG	GTC	TTT	GTA	CTT	TTT	GCA	GTT	TGC	TGG	768
Asn	Phe	Leu	Thr	Met	Phe	Val	Val	Phe	Val	Leu	Phe	Ala	Val	Cys	Trp	
				245					250					255		

GCC CCC TTA AAC TTT ATC GGC CTT GCT GTG GCC ATT AAT CCG TTT CAT	816
Ala Pro Leu Asn Phe Ile Gly Leu Ala Val Ala Ile Asn Pro Phe His	
260 265 270	
GTG GCA CCA AAG ATT CCA GAA TGG CTG TTT GTT TTA AGC TAT TTC ATG	864
Val Ala Pro Lys Ile Pro Glu Trp Leu Phe Val Leu Ser Tyr Phe Met	
275 280 285	
GCC TAT TTT AAC AGT TGT CTC AAT GCT GTT ATA TAT GGT GTG CTA AAT	912
Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Ala Val Ile Tyr Gly Val Leu Asn	
290 295 300	
CAA AAC TTC CGC AAG GAG TAC AAA AGA ATA CTG ATG TCC TTA TTG ACT	960
Gln Asn Phe Arg Lys Glu Tyr Lys Arg Ile Leu Met Ser Leu Leu Thr	
305 310 315 320	
CCA AGA CTG TTG TTT CTT GAC ACA TCT AGA GGA GGA ACT GAG GGA TTG	1008
Pro Arg Leu Leu Phe Leu Asp Thr Ser Arg Gly Gly Thr Glu Gly Leu	
325 330 335	
AAA AGT AAG CCT TCG CCA GCT GTA ACC AAC AAC AAT CAA GCA GAT ATG	1056
Lys Ser Lys Pro Ser Pro Ala Val Thr Asn Asn Asn Gln Ala Asp Met	
340 345 350	
TAC GTG TAA ACACAGCTTT CCACCAATAT GTACTCTGTT TCAACTATGA	1105
Tyr Val *	
355	
ATACAAGTTT CTTTTATGGC AGTTGCACCA TGTGCCTAAT TCTGTCCATT CATTCTAAAA	1165
TTTTTGTATA AACATACATT CTGTTGGTTT GACAGGGACA AGAGGTCTTG CTTCTCTGCA	1225
GAAAAGAAAT ATTTTGAAAT CTTGGCTGAT TTGTTATTAA TAACCATAAA TGGAATATCT	1285
TAAAAAAAAA AAAAAAAAAA GAATTC	1311

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 355 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Met Met Glu Val Asn Ser Thr Cys Leu Asp Cys Arg Thr Pro Gly Thr	
1 5 10 15	
Ile Arg Thr Glu Gln Asp Ala Gln Asp Ser Ala Ser Gln Gly Leu Thr	
20 25 30	
Ser Ala Leu Ala Val Val Leu Ile Phe Thr Ile Val Val Asp Val Leu	
35 40 45	
Gly Asn Ile Leu Val Ile Leu Ser Val Leu Arg Asn Lys Lys Leu Gln	
50 55 60	
Asn Ala Gly Asn Leu Phe Val Val Ser Leu Ser Ile Ala Asp Leu Val	
65 70 75 80	
Val Ala Val Tyr Pro Tyr Pro Val Ile Leu Ile Ala Ile Phe Gln Asn	
85 90 95	

27

Gly Trp Thr Leu Gly Asn Ile His Cys Gln Ile Ser Gly Phe Leu Met
 100 105 110
 Gly Leu Ser Val Ile Gly Ser Val Phe Asn Ile Thr Ala Ile Ala Ile
 115 120 125
 Asn Arg Tyr Cys Tyr Ile Cys His Ser Leu Arg Tyr Asp Lys Leu Tyr
 130 135 140
 Asn Gln Arg Ser Thr Trp Cys Tyr Leu Gly Leu Thr Trp Ile Leu Thr
 145 150 155 160
 Ile Ile Ala Ile Val Pro Asn Phe Phe Val Gly Ser Leu Gln Tyr Asp
 165 170 175
 Pro Arg Ile Phe Ser Cys Thr Phe Ala Gln Thr Val Ser Ser Ser Tyr
 180 185 190
 Thr Ile Thr Val Val Val Val His Phe Ile Val Pro Leu Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Phe Cys Tyr Leu Arg Ile Trp Val Leu Val Ile Gln Val Lys His
 210 215 220
 Arg Val Arg Gln Asp Phe Lys Gln Lys Leu Thr Gln Thr Asp Leu Arg
 225 230 235 240
 Asn Phe Leu Thr Met Phe Val Val Phe Val Leu Phe Ala Val Cys Trp
 245 250 255
 Ala Pro Leu Asn Phe Ile Gly Leu Ala Val Ala Ile Asn Pro Phe His
 260 265 270
 Val Ala Pro Lys Ile Pro Glu Trp Leu Phe Val Leu Ser Tyr Phe Met
 275 280 285
 Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Ala Val Ile Tyr Gly Val Leu Asn
 290 295 300
 Gln Asn Phe Arg Lys Glu Tyr Lys Arg Ile Leu Met Ser Leu Leu Thr
 305 310 315 320
 Pro Arg Leu Leu Phe Leu Asp Thr Ser Arg Gly Gly Thr Glu Gly Leu
 325 330 335
 Lys Ser Lys Pro Ser Pro Ala Val Thr Asn Asn Asn Gln Ala Asp Met
 340 345 350
 Tyr Val *
 355

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
- (A) LONGUEUR: 1147 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

- (ix) CARACTERISTIQUE:
- (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMPLACEMENT: 1..1065

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATG ATG GAG GTG AAT AGC ACT TGC TTG GAT TGC AGG ACA CCT GGT ACC	48
Met Met Glu Val Asn Ser Thr Cys Leu Asp Cys Arg Thr Pro Gly Thr	
ATA CGA ACA GAG CAG GAT GCA CAG GAC AGC GCA TCT CAG GGA CTC ACC	96
Ile Arg Thr Glu Gln Asp Ala Gln Asp Ser Ala Ser Gln Gly Leu Thr	
TCT GCC CTG GCG GTG GTT CTT ATA TTC ACC ATT GTT GTG GAT GTC CTG	144
Ser Ala Leu Ala Val Val Leu Ile Phe Thr Ile Val Val Asp Val Leu	
GGC AAT ATA TTG GTC ATT TTG TCT GTC CTG AGG AAC AAG AAG CTG CAG	192
Gly Asn Ile Leu Val Ile Leu Ser Val Leu Arg Asn Lys Lys Leu Gln	
AAT GCT GGA AAT CTC TTT GTT GTC AGT TTG TCT ATT GCC GAT CTG GTT	240
Asn Ala Gly Asn Leu Phe Val Val Ser Leu Ser Ile Ala Asp Leu Val	
GTT GCT GTG TAT CCC TAT CCG GTA ATT CTC ATA GCT ATT TTC CAG AAT	288
Val Ala Val Tyr Pro Tyr Pro Val Ile Leu Ile Ala Ile Phe Gln Asn	
GGG TGG ACG CTT GGA AAT ATC CAT TGT CAG ATC AGT GGC TTC CTG ATG	336
Gly Trp Thr Leu Gly Asn Ile His Cys Gln Ile Ser Gly Phe Leu Met	
GGA CTC AGC GTT ATT GGA TCA GTC TTC AAC ATA ACA GCC ATA GCT ATC	384
Gly Leu Ser Val Ile Gly Ser Val Phe Asn Ile Thr Ala Ile Ala Ile	
AAC AGG TAT TGC TAC ATC TGC CAC AGC CTG AGA TAT GAC AAG CTT TAT	432
Asn Arg Tyr Cys Tyr Ile Cys His Ser Leu Arg Tyr Asp Lys Leu Tyr	
AAT CAA AGA AGC ACC TGG TGC TAC CTT GGC CTG ACA TGG ATA CTA ACT	480
Asn Gln Arg Ser Thr Trp Cys Tyr Leu Gly Leu Thr Trp Ile Leu Thr	
ATA ATT GCA ATC GTG CCA AAC TTT TTT GTT GGA TCA CTA CAG TAT GAC	528
Ile Ile Ala Ile Val Pro Asn Phe Phe Val Gly Ser Leu Gln Tyr Asp	
CCC AGG ATT TTT TCT TGC ACA TTT GCG CAG ACA GTG AGT TCC TCA TAC	576
Pro Arg Ile Phe Ser Cys Thr Phe Ala Gln Thr Val Ser Ser Ser Tyr	
ACC ATA ACA GTA GTG GTG GTG CAT TTT ATA GTC CCT CTT AGT GTT GTG	624
Thr Ile Thr Val Val Val Val His Phe Ile Val Pro Leu Ser Val Val	
ACA TTC TGT TAC TTA AGA ATA TGG GTT TTA GTG ATC CAA GTC AAA CAC	672
Thr Phe Cys Tyr Leu Arg Ile Trp Val Leu Val Ile Gln Val Lys His	
AGA GTT AGA CAA GAC TTC AAG CAA AAG TTG ACA CAA ACA GAC TTG AGA	720
Arg Val Arg Gln Asp Phe Lys Gln Lys Leu Thr Gln Thr Asp Leu Arg	
AAT TTC TTG ACC ATG TTT GTG GTC TTT GTA CTT TTT GCA GTT TGC TGG	768
Asn Phe Leu Thr Met Phe Val Val Phe Val Leu Phe Ala Val Cys Trp	
GCC CCC TTA AAC TTT ATC GGC CTT GCT GTG GCC ATT AAT CCG TTT CAT	816
Ala Pro Leu Asn Phe Ile Gly Leu Ala Val Ala Ile Asn Pro Phe His	
GTG GCA CCA AAG ATT CCA GAA TGG CTG TTT GTT TTA AGC TAT TTC ATG	864
Val Ala Pro Lys Ile Pro Glu Trp Leu Phe Val Leu Ser Tyr Phe Met	
GCC TAT TTT AAC AGT TGT CTC AAT GCT GTT ATA TAT GGT GTG CTA AAT	912
Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Ala Val Ile Tyr Gly Val Leu Asn	
CAA AAC TTC CGC AAG GAG TAC AAA AGA ATA CTG ATG TCC TTA TTG ACT	960
Gln Asn Phe Arg Lys Glu Tyr Lys Arg Ile Leu Met Ser Leu Leu Thr	
CCA AGA CTG TTG TTT CTT GAC ACA TCT AGA GGA GGA ACT GAG GGA TTG	1008
Pro Arg Leu Leu Phe Leu Asp Thr Ser Arg Gly Gly Thr Glu Gly Leu	

AAA AGT AAG CCT TCG CCA GCT GTA ACC AAC AAC AAT CAA GCA GAT ATG 1056
Lys Ser Lys Pro Ser Pro Ala Val Thr Asn Asn Asn Gln Ala Asp Met

TAC GTG TAA ACACAGCTTT CCACCAATAT GTACTCTGTT TCAACTATGA 1105
Tyr Val *

ATACAAGTTT CTTTTATGGC AAAAAAAAAA AAAAAAGAAT TC 1147

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 355 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Met	Met	Glu	Val	Asn	Ser	Thr	Cys	Leu	Asp	Cys	Arg	Thr	Pro	Gly	Thr	
1				5					10					15		
Ile	Arg	Thr	Glu	Gln	Asp	Ala	Gln	Asp	Ser	Ala	Ser	Gln	Gly	Leu	Thr	
			20					25					30			
Ser	Ala	Leu	Ala	Val	Val	Leu	Ile	Phe	Thr	Ile	Val	Val	Asp	Val	Leu	
		35					40					45				
Gly	Asn	Ile	Leu	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Leu	Arg	Asn	Lys	Lys	Leu	Gln	
	50					55					60					
Asn	Ala	Gly	Asn	Leu	Phe	Val	Val	Ser	Leu	Ser	Ile	Ala	Asp	Leu	Val	
	65				70					75					80	
Val	Ala	Val	Tyr	Pro	Tyr	Pro	Val	Ile	Leu	Ile	Ala	Ile	Phe	Gln	Asn	
				85					90					95		
Gly	Trp	Thr	Leu	Gly	Asn	Ile	His	Cys	Gln	Ile	Ser	Gly	Phe	Leu	Met	
			100					105					110			
Gly	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Ser	Val	Phe	Asn	Ile	Thr	Ala	Ile	Ala	Ile	
	115						120					125				
Asn	Arg	Tyr	Cys	Tyr	Ile	Cys	His	Ser	Leu	Arg	Tyr	Asp	Lys	Leu	Tyr	
	130					135					140					
Asn	Gln	Arg	Ser	Thr	Trp	Cys	Tyr	Leu	Gly	Leu	Thr	Trp	Ile	Leu	Thr	
	145				150					155				160		
Ile	Ile	Ala	Ile	Val	Pro	Asn	Phe	Phe	Val	Gly	Ser	Leu	Gln	Tyr	Asp	
			165						170					175		
Pro	Arg	Ile	Phe	Ser	Cys	Thr	Phe	Ala	Gln	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	
			180					185					190			
Thr	Ile	Thr	Val	Val	Val	Val	His	Phe	Ile	Val	Pro	Leu	Ser	Val	Val	
		195					200					205				
Thr	Phe	Cys	Tyr	Leu	Arg	Ile	Trp	Val	Leu	Val	Ile	Gln	Val	Lys	His	
	210					215					220					
Arg	Val	Arg	Gln	Asp	Phe	Lys	Gln	Lys	Leu	Thr	Gln	Thr	Asp	Leu	Arg	
	225				230					235				240		
Asn	Phe	Leu	Thr	Met	Phe	Val	Val	Phe	Val	Leu	Phe	Ala	Val	Cys	Trp	
			245						250					255		

Ala Pro Leu Asn Phe Ile Gly Leu Ala Val Ala Ile Asn Pro Phe His
 260 265 270

Val Ala Pro Lys Ile Pro Glu Trp Leu Phe Val Leu Ser Tyr Phe Met
 275 280 285

Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Ala Val Ile Tyr Gly Val Leu Asn
 290 295 300

Gln Asn Phe Arg Lys Glu Tyr Lys Arg Ile Leu Met Ser Leu Leu Thr
 305 310 315 320

Pro Arg Leu Leu Phe Leu Asp Thr Ser Arg Gly Gly Thr Glu Gly Leu
 325 330 335

Lys Ser Lys Pro Ser Pro Ala Val Thr Asn Asn Asn Gln Ala Asp Met
 340 345 350

Tyr Val *
 355

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1312 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMMENT:1..1065

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

ATG ATG GAG GTG AAT AGC ACT TGC TTG GAT TGC AGG ACA CCT GGT ACC	48
Met Met Glu Val Asn Ser Thr Cys Leu Asp Cys Arg Thr Pro Gly Thr	
ATA CGA ACA GAG CAG GAT GCA CAG GAC AGC GCA TCT CAG GGA CTC ACC	96
Ile Arg Thr Glu Gln Asp Ala Gln Asp Ser Ala Ser Gln Gly Leu Thr	
TCT GCC CTG GCG GTG GTT CTT ATA TTC ACC ATT GTT GTG GAT GTC CTG	144
Ser Ala Leu Ala Val Val Leu Ile Phe Thr Ile Val Val Asp Val Leu	
GGC AAT ATA TTG GTC ATT TTG TCT GTC CTG AGG AAC AAG AAG CTG CAG	192
Gly Asn Ile Leu Val Ile Leu Ser Val Leu Arg Asn Lys Lys Leu Gln	
AAT GCT GGA AAT CTC TTT GTT GTC AGT TTG TCT ATT GCC GAT CTG GTT	240
Asn Ala Gly Asn Leu Phe Val Val Ser Leu Ser Ile Ala Asp Leu Val	
GTT GCT GTG TAT CCC TAT CCG GTA ATT CTC ATA GCT ATT TTC CAG AAT	288
Val Ala Val Tyr Pro Tyr Pro Val Ile Leu Ile Ala Ile Phe Gln Asn	
GGG TGG ACG CTT GGA AAT ATC CAT TGT CAG ATC AGT GGC TTC CTG ATG	336
Gly Trp Thr Leu Gly Asn Ile His Cys Gln Ile Ser Gly Phe Leu Met	
GGA CTC AGC GTT ATT GGA TCA GTC TTC AAC ATA ACA GCC ATA GCT ATC	384
Gly Leu Ser Val Ile Gly Ser Val Phe Asn Ile Thr Ala Ile Ala Ile	
AAC AGG TAT TGC TAC ATC TGC CAC AGC CTG AGA TAT GAC AAG CTT TTT	432
Asn Arg Tyr Cys Tyr Ile Cys His Ser Leu Arg Tyr Asp Lys Leu Phe	

AAT CAA AGA AGC ACC TGG TTC TAC CTT GGC CTG ACA TGG ATA CTA ACC Asn Gln Arg Ser Thr Trp Phe Tyr Leu Gly Leu Thr Trp Ile Leu Thr	480
ATA ATT GCC ATT GTG CCA AAC TTT TTT GTT GGA TCA CTA CAG TAT GAC Ile Ile Ala Ile Val Pro Asn Phe Phe Val Gly Ser Leu Gln Tyr Asp	528
CCC AGG ATT TTC TCT TGC ACA TTT GCG CAG ACC GTA AGT TCC TCA TAC Pro Arg Ile Phe Ser Cys Thr Phe Ala Gln Thr Val Ser Ser Ser Tyr	576
ACC ATA ACA GTA GTG GTA GTG CAT TTT ATA GTC CCT CTT AGT GTT GTG Thr Ile Thr Val Val Val Val His Phe Ile Val Pro Leu Ser Val Val	624
ACA TTC TGC TAC TTA AGA ATA TGG GTT TTA GTG ATC CAA GTC AAA CAC Thr Phe Cys Tyr Leu Arg Ile Trp Val Leu Val Ile Gln Val Lys His	672
AGA GTT AGA CAA GAC TTC AAG CAA AAG TTG ACA CCA ACA GAC TTG AGA Arg Val Arg Gln Asp Phe Lys Gln Lys Leu Thr Pro Thr Asp Leu Arg	720
AAT TTC TTG ACC ATG TTT GTG GTC TTT GTA CTT TTT GCC GTT TGC TGG Asn Phe Leu Thr Met Phe Val Val Phe Val Leu Phe Ala Val Cys Trp	768
GCA CCC TTG AAT TTT ATC GGC CTT GCT GTG GCC ATT AAC CCA CTC CAC Ala Pro Leu Asn Phe Ile Gly Leu Ala Val Ala Ile Asn Pro Leu His	816
GTG GCA CCA AAG ATT CCA GAG TGG TTG TTT GTG TTA AGC TAT TTC ATG Val Ala Pro Lys Ile Pro Glu Trp Leu Phe Val Leu Ser Tyr Phe Met	864
GCC TAT TTT AAC AGC TGT CTC AAT GCT GTC ATC TAC GGT CTG CTA AAT Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Ala Val Ile Tyr Gly Leu Leu Asn	912
CAA AAC TTC CGC AAG GAA TAC AAA CGA ATA TTG ATG TCC TTA TGG ACT Gln Asn Phe Arg Lys Glu Tyr Lys Arg Ile Leu Met Ser Leu Trp Thr	960
CCA AGA CTG TTG TTT CTT GAC ACA TCT AGA GGA GGA ACT GAG GGA TTG Pro Arg Leu Leu Phe Leu Asp Thr Ser Arg Gly Gly Thr Glu Gly Leu	1008
AAA AGT AAG CCT TCG CCA GCT GTA ACC AAC AAC AAT CAA GCA GAT ATG Lys Ser Lys Pro Ser Pro Ala Val Thr Asn Asn Asn Gln Ala Asp Met	1056
TAC GTG TAA ACACAGCTTT CCACCAATAT GTACTCTGTT TCAACTATGA Tyr Val *	1105
ATACAAGTTT CTTTTATGGC AGTTGCACCA TGTGCCTAAT TCTGTCCATT CATTCTAAAA	1165
TTTTTGTATA AACATACATT CTGTTGGTTT GACAGGGACA AGAGGTCTTG CTTCTCTGCA	1225
GAAAAGAAAT ATTTTGAAAT CTTGGCTGAT TTGTTATTAA TAACCATAAA TGGAATATCT	1285
TTAAAAA AAAAAAAGAATTC	1312

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 355 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Met Met Glu Val Asn Ser Thr Cys Leu Asp Cys Arg Thr Pro Gly Thr
1 5 10 15

32

Ile Arg Thr Glu Gln Asp Ala Gln Asp Ser Ala Ser Gln Gly Leu Thr
 20 25 30
 Ser Ala Leu Ala Val Val Leu Ile Phe Thr Ile Val Val Asp Val Leu
 35 40 45
 Gly Asn Ile Leu Val Ile Leu Ser Val Leu Arg Asn Lys Lys Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ala Gly Asn Leu Phe Val Val Ser Leu Ser Ile Ala Asp Leu Val
 65 70 75 80
 Val Ala Val Tyr Pro Tyr Pro Val Ile Leu Ile Ala Ile Phe Gln Asn
 85 90 95
 Gly Trp Thr Leu Gly Asn Ile His Cys Gln Ile Ser Gly Phe Leu Met
 100 105 110
 Gly Leu Ser Val Ile Gly Ser Val Phe Asn Ile Thr Ala Ile Ala Ile
 115 120 125
 Asn Arg Tyr Cys Tyr Ile Cys His Ser Leu Arg Tyr Asp Lys Leu Phe
 130 135 140
 Asn Gln Arg Ser Thr Trp Phe Tyr Leu Gly Leu Thr Trp Ile Leu Thr
 145 150 155 160
 Ile Ile Ala Ile Val Pro Asn Phe Phe Val Gly Ser Leu Gln Tyr Asp
 165 170 175
 Pro Arg Ile Phe Ser Cys Thr Phe Ala Gln Thr Val Ser Ser Ser Tyr
 180 185 190
 Thr Ile Thr Val Val Val Val His Phe Ile Val Pro Leu Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Phe Cys Tyr Leu Arg Ile Trp Val Leu Val Ile Gln Val Lys His
 210 215 220
 Arg Val Arg Gln Asp Phe Lys Gln Lys Leu Thr Pro Thr Asp Leu Arg
 225 230 235 240
 Asn Phe Leu Thr Met Phe Val Val Phe Val Leu Phe Ala Val Cys Trp
 245 250 255
 Ala Pro Leu Asn Phe Ile Gly Leu Ala Val Ala Ile Asn Pro Leu His
 260 265 270
 Val Ala Pro Lys Ile Pro Glu Trp Leu Phe Val Leu Ser Tyr Phe Met
 275 280 285
 Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Ala Val Ile Tyr Gly Leu Leu Asn
 290 295 300
 Gln Asn Phe Arg Lys Glu Tyr Lys Arg Ile Leu Met Ser Leu Trp Thr
 305 310 315 320
 Pro Arg Leu Leu Phe Leu Asp Thr Ser Arg Gly Gly Thr Glu Gly Leu
 325 330 335
 Lys Ser Lys Pro Ser Pro Ala Val Thr Asn Asn Asn Gln Ala Asp Met
 340 345 350
 Tyr Val *
 355

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1147 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc pour ARNm

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..1065

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

ATG ATG GAG GTG AAT AGC ACT TGC TTG GAT TGC AGG ACA CCT GGT ACC	48
Met Met Glu Val Asn Ser Thr Cys Leu Asp Cys Arg Thr Pro Gly Thr	
ATA CGA ACA GAG CAG GAT GCA CAG GAC AGC GCA TCT CAG GGA CTC ACC	96
Ile Arg Thr Glu Gln Asp Ala Gln Asp Ser Ala Ser Gln Gly Leu Thr	
TCT GCC CTG GCG GTG GTT CTT ATA TTC ACC ATT GTT GTG GAT GTC CTG	144
Ser Ala Leu Ala Val Val Leu Ile Phe Thr Ile Val Val Asp Val Leu	
GGC AAT ATA TTG GTC ATT TTG TCT GTC CTG AGG AAC AAG AAG CTG CAG	192
Gly Asn Ile Leu Val Ile Leu Ser Val Leu Arg Asn Lys Lys Leu Gln	
AAT GCT GGA AAT CTC TTT GTT GTC AGT TTG TCT ATT GCC GAT CTG GTT	240
Asn Ala Gly Asn Leu Phe Val Val Ser Leu Ser Ile Ala Asp Leu Val	
GTT GCT GTG TAT CCC TAT CCG GTA ATT CTC ATA GCT ATT TTC CAG AAT	288
Val Ala Val Tyr Pro Tyr Pro Val Ile Leu Ile Ala Ile Phe Gln Asn	
GGG TGG ACG CTT GGA AAT ATC CAT TGT CAG ATC AGT GGC TTC CTG ATG	336
Gly Trp Thr Leu Gly Asn Ile His Cys Gln Ile Ser Gly Phe Leu Met	
GGA CTC AGC GTT ATT GGA TCA GTC TTC AAC ATA ACA GCC ATA GCT ATC	384
Gly Leu Ser Val Ile Gly Ser Val Phe Asn Ile Thr Ala Ile Ala Ile	
AAC AGG TAT TGC TAC ATC TGC CAC AGC CTG AGA TAT GAC AAG CTT TTT	432
Asn Arg Tyr Cys Tyr Ile Cys His Ser Leu Arg Tyr Asp Lys Leu Phe	
AAT CAA AGA AGC ACC TGG TTC TAC CTT GGC CTG ACA TGG ATA CTA ACC	480
Asn Gln Arg Ser Thr Trp Phe Tyr Leu Gly Leu Thr Trp Ile Leu Thr	
ATA ATT GCC ATT GTG CCA AAC TTT TTT GTT GGA TCA CTA CAG TAT GAC	528
Ile Ile Ala Ile Val Pro Asn Phe Phe Val Gly Ser Leu Gln Tyr Asp	
CCC AGG ATT TTC TCT TGC ACA TTT GCG CAG ACC GTA AGT TCC TCA TAC	576
Pro Arg Ile Phe Ser Cys Thr Phe Ala Gln Thr Val Ser Ser Ser Tyr	
ACC ATA ACA GTA GTG GTA GTG CAT TTT ATA GTC CCT CTT AGT GTT GTG	624
Thr Ile Thr Val Val Val Val His Phe Ile Val Pro Leu Ser Val Val	
ACA TTC TGC TAC TTA AGA ATA TGG GTT TTA GTG ATC CAA GTC AAA CAC	672
Thr Phe Cys Tyr Leu Arg Ile Trp Val Leu Val Ile Gln Val Lys His	
AGA GTT AGA CAA GAC TTC AAG CAA AAG TTG ACA CCA ACA GAC TTG AGA	720
Arg Val Arg Gln Asp Phe Lys Gln Lys Leu Thr Pro Thr Asp Leu Arg	
AAT TTC TTG ACC ATG TTT GTG GTC TTT GTA CTT TTT GCC GTT TGC TGG	768
Asn Phe Leu Thr Met Phe Val Val Phe Val Leu Phe Ala Val Cys Trp	

GCA CCC TTG AAT TTT ATC GGC CTT GCT GTG GCC ATT AAC CCA CTC CAC	816
Ala Pro Leu Asn Phe Ile Gly Leu Ala Val Ala Ile Asn Pro Leu His	
GTG GCA CCA AAG ATT CCA GAG TGG TTG TTT GTG TTA AGC TAT TTC ATG	864
Val Ala Pro Lys Ile Pro Glu Trp Leu Phe Val Leu Ser Tyr Phe Met	
GCC TAT TTT AAC AGC TGT CTC AAT GCT GTC ATC TAC GGT CTG CTA AAT	912
Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Ala Val Ile Tyr Gly Leu Leu Asn	
CAA AAC TTC CGC AAG GAA TAC AAA CGA ATA TTG ATG TCC TTA TGG ACT	960
Gln Asn Phe Arg Lys Glu Tyr Lys Arg Ile Leu Met Ser Leu Trp Thr	
CCA AGA CTG TTG TTT CTT GAC ACA TCT AGA GGA GGA ACT GAG GGA TTG	1008
Pro Arg Leu Leu Phe Leu Asp Thr Ser Arg Gly Gly Thr Glu Gly Leu	
AAA AGT AAG CCT TCG CCA GCT GTA ACC AAC AAC AAT CAA GCA GAT ATG	1056
Lys Ser Lys Pro Ser Pro Ala Val Thr Asn Asn Asn Gln Ala Asp Met	
TAC GTG TAA ACACAGCTTT CCACCAATAT GTACTCTGTT TCAACTATGA	1105
Tyr Val *	
ATACAAGTTT CTTTTATGGC AAAAAAAAAA AAAAAAGAAT TC	1147

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 355 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Met Met Glu Val Asn Ser Thr Cys Leu Asp Cys Arg Thr Pro Gly Thr	
1 5 10 15	
Ile Arg Thr Glu Gln Asp Ala Gln Asp Ser Ala Ser Gln Gly Leu Thr	
20 25 30	
Ser Ala Leu Ala Val Val Leu Ile Phe Thr Ile Val Val Asp Val Leu	
35 40 45	
Gly Asn Ile Leu Val Ile Leu Ser Val Leu Arg Asn Lys Lys Leu Gln	
50 55 60	
Asn Ala Gly Asn Leu Phe Val Val Ser Leu Ser Ile Ala Asp Leu Val	
65 70 75 80	
Val Ala Val Tyr Pro Tyr Pro Val Ile Leu Ile Ala Ile Phe Gln Asn	
85 90 95	
Gly Trp Thr Leu Gly Asn Ile His Cys Gln Ile Ser Gly Phe Leu Met	
100 105 110	
Gly Leu Ser Val Ile Gly Ser Val Phe Asn Ile Thr Ala Ile Ala Ile	
115 120 125	
Asn Arg Tyr Cys Tyr Ile Cys His Ser Leu Arg Tyr Asp Lys Leu Phe	
130 135 140	
Asn Gln Arg Ser Thr Trp Phe Tyr Leu Gly Leu Thr Trp Ile Leu Thr	
145 150 155 160	
Ile Ile Ala Ile Val Pro Asn Phe Phe Val Gly Ser Leu Gln Tyr Asp	
165 170 175	

35

Pro Arg Ile Phe Ser Cys Thr Phe Ala Gln Thr Val Ser Ser Ser Tyr
 180 185 190
 Thr Ile Thr Val Val Val Val His Phe Ile Val Pro Leu Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Phe Cys Tyr Leu Arg Ile Trp Val Leu Val Ile Gln Val Lys His
 210 215 220
 Arg Val Arg Gln Asp Phe Lys Gln Lys Leu Thr Pro Thr Asp Leu Arg
 225 230 235 240
 Asn Phe Leu Thr Met Phe Val Val Phe Val Leu Phe Ala Val Cys Trp
 245 250 255
 Ala Pro Leu Asn Phe Ile Gly Leu Ala Val Ala Ile Asn Pro Leu His
 260 265 270
 Val Ala Pro Lys Ile Pro Glu Trp Leu Phe Val Leu Ser Tyr Phe Met
 275 280 285
 Ala Tyr Phe Asn Ser Cys Leu Asn Ala Val Ile Tyr Gly Leu Leu Asn
 290 295 300
 Gln Asn Phe Arg Lys Glu Tyr Lys Arg Ile Leu Met Ser Leu Trp Thr
 305 310 315 320
 Pro Arg Leu Leu Phe Leu Asp Thr Ser Arg Gly Gly Thr Glu Gly Leu
 325 330 335
 Lys Ser Lys Pro Ser Pro Ala Val Thr Asn Asn Asn Gln Ala Asp Met
 340 345 350
 Tyr Val *
 355

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

AGAAATGATG GAGGTGAATA GCA

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:
CGGCAATAGA CAAACTGACA ACA 23
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:
TATTGGTCAT TTTGTCTGTC 20
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:
CCAGGTGCTT CTTTGATTAT 20
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:
CTTCAACATA ACAGCCATAG C 21
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:
TGCTTGATTG TTGTTGGTTA C

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:
TATGGTGTGC TAAATCAAAA CTTCCGCAAG GAGTA

35

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 35 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:
TACTGATGTC CTTATTGACT CCAAGACTGT TGTTT

35

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:
AGAAATGATG GAGGTGAATA GCA

23

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 19 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
 - (A) DESCRIPTION: /desc = "AMORCE"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:
TTAGAATGAA TGGACAGAA

19

MICRO-ORGANISMES	
Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page -- 4 -- , ligne 15 de la description 1	
A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :	
D'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire : <input checked="" type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt :	
Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) :	
28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15	
Date du dépôt :	N° d'ordre :
7 juin 1995	I-1583
B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES : (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
<p>"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de la délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant. (règle 28.4) de la CBE)".</p>	
C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES : (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)	
EUROPE AUSTRALIE CANADA CHINE	JAPON NORVEGE NOUVELLE-ZELANDE ETATS-UNIS D'AMERIQUE
D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT : (à ne remplir que si nécessaire)	
Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau international : (spécifier la nature générale des indications p. ex., « No d'ordre du dépôt »)	
E. <input type="checkbox"/> La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)	
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="border-bottom: 1px solid black; width: 150px; margin-bottom: 5px;"></div> <div style="margin-left: 10px;"> </div> </div> (Fonctionnaire autorisé)	
<input type="checkbox"/> Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international :	
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="border-bottom: 1px solid black; width: 150px; margin-bottom: 5px;"></div> <div style="margin-left: 10px;"> </div> </div> (Fonctionnaire autorisé)	

MICRO-ORGANISMES	
Feuille facultative relative au micro-organisme mentionné en page <u>4</u> , ligne <u>21</u> de la description 1	
A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :	
D'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire : <input type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt :	
Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) :	
28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15	
Date du dépôt :	N° d'ordre :
7 juin 1995	I-1584
B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES : (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
<p>"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de la délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant. (règle 28.4) de la CBE)".</p>	
C. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES : (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)	
EUROPE AUSTRALIE CANADA CHINE	JAPON NORVEGE NOUVELLE-ZELANDE ETATS-UNIS D'AMERIQUE
D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT : (à ne remplir que si nécessaire)	
Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau international : (spécifier la nature générale des indications p. ex., « No d'ordre du dépôt »)	
E. <input type="checkbox"/> La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par l'office récepteur)	
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center;"> <div style="border-bottom: 1px solid black; width: 150px; margin-right: 10px;"></div> <div style="text-align: center;"> </div> </div> (Fonctionnaire autorisé)	
<input type="checkbox"/> Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau international :	
<div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center;"> <div style="border-bottom: 1px solid black; width: 150px; margin-right: 10px;"></div> <div style="text-align: center;"> </div> </div> (Fonctionnaire autorisé)	

Revendications

1°) Séquences nucléiques codant pour des récepteurs fonctionnels de la mélatonine de type MEL1 A ou Mel_{1c}, caractérisées en ce qu'elles sont sélectionnées parmi les séquences suivantes : SEQ ID N° 1, SEQ ID N°3, SEQ ID N°5 ou SEQ ID
5 N°7.

2°) Fragments des séquences selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe qui comprend :

- une séquence constituée d'un segment de 230 paires de bases nucléotidiques, correspondant aux nucléotides 1057-1286 des SEQ ID N° 1 ou SEQ ID
10 N°5 ;

- une séquence constituée d'un segment de 69 paires de bases nucléotidiques, correspondant aux nucléotides 1057-1125 des SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N°7.

3°) Sondes nucléotidiques, caractérisées en ce qu'elles s'hybrident
15 avec les séquences nucléotidiques selon la revendication 1 ou la revendication 2.

4°) Protéine et/ou fragments de protéine, caractérisés en ce qu'ils sont codés par une séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou la revendication 2 et en ce qu'ils présentent une activité de récepteur de la mélatonine de type MEL1 A fonctionnel.

20 5°) Protéine selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle présente l'une quelconque des séquences suivantes : SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°6.

6°) Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou la revendication 2.

25 7°) Vecteur selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est constitué par un plasmide comprenant un promoteur RSV et la SEQ ID N° 1.

8°) Vecteur selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il a été déposé sous le n° I-1583 en date du 7 juin 1995 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.

30 9°) Vecteur selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est constitué par un plasmide comprenant un promoteur RSV et la SEQ ID N° 5.

10°) Vecteur selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il a été déposé sous le n° I-1584 en date du 7 juin 1995 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur.

11°) Cellule hôte appropriée, obtenue par transformation génétique, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 6 à 10.

12°) Cellule hôte selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle est constituée par les cellules de la lignée L.

13°) Processus d'expression d'une protéine selon la revendication 4 ou la revendication 5, caractérisé en ce que la cellule hôte, résultant de la transformation par un vecteur contenant une séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou la revendication 2 codant pour une protéine ayant une activité de récepteur fonctionnel de la mélatonine de type MEL1 A, est cultivée de manière à produire et à transporter ladite protéine exprimée vers la membrane, de telle sorte que les séquences transmembranaires dudit récepteur soient exposées à la surface de la membrane de l'hôte cellulaire transformé.

14°) Modèle d'étude des récepteurs de la mélatonine de type MEL1 A, caractérisé en ce qu'il est constitué par des cellules hôtes selon la revendication 11 ou la revendication 12, c'est-à-dire exprimant un récepteur fonctionnel de la mélatonine de type MEL1 A à la surface de leur membrane cellulaire.

15°) Procédé de détection de la capacité d'une substance à se comporter comme ligand vis-à-vis d'une protéine selon la revendication 4 ou la revendication 5, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact de ladite substance avec une cellule hôte préalablement transformée par un vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, laquelle cellule hôte exprime ladite protéine (récepteur de la mélatonine), et laquelle mise en contact est réalisée dans des conditions permettant la formation d'une liaison entre l'un au moins des sites spécifiques et ladite substance et
- la détection de la formation éventuelle d'un complexe de type ligand-protéine.

16°) Procédé pour l'étude de l'affinité d'une protéine selon la revendication 4 ou la revendication 5 pour un ou plusieurs ligands déterminés, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- la transformation d'une cellule hôte appropriée par un vecteur selon l'une quelconque des revendications 6 à 10 ;
 - la culture de la cellule hôte transformée, dans des conditions permettant l'expression du récepteur de la mélatonine de type MEL1 A, codé par la séquence nucléotidique, et le transfert du récepteur de la mélatonine exprimé vers la membrane de ladite cellule de sorte que les séquences transmembranaires du récepteur fonctionnel de la mélatonine soient exposées à la surface de la cellule hôte transformée ;
 - la mise en contact de ladite cellule avec les ligands déterminés et
 - la détection d'une réaction affine entre ladite cellule transformée et lesdits ligands déterminés.
- 17°) Kit pour la détection de l'affinité éventuelle d'un ligand pour une protéine selon la revendication 4 ou la revendication 5, lequel kit est caractérisé en ce qu'il comprend :
- une culture de cellules hôtes transformées par un vecteur d'expression selon l'une quelconque des revendications 6 à 10 ;
 - éventuellement, si nécessaire, des moyens physiques ou chimiques pour induire l'expression d'une protéine (récepteur de la mélatonine de type MEL1 A), codée par une séquence nucléotidique selon la revendication 1 ou la revendication 2, contenue dans un vecteur dont le promoteur est inductible ;
 - un ou plusieurs ligands témoins ayant des affinités déterminées pour ladite protéine ; et
 - des moyens physiques ou chimiques pour la caractérisation de l'activité biologique de la protéine exprimée.

CLONAGE DE L'ADNc D'UN RECEPTEUR
DE LA MELATONINE A PARTIR DE *XENOPUS LAEVIS*

Stratégie RT-PCR

préparation d'ARN à partir de la peau de *Xenopus*



amplification des fragments d'ADNc en utilisant
des amorces PCR spécifiques



clonage des fragments dans des vecteurs d'expression
appropriés (pcDNA3-RSV)



transfection dans des cellules L

FIGURE 1

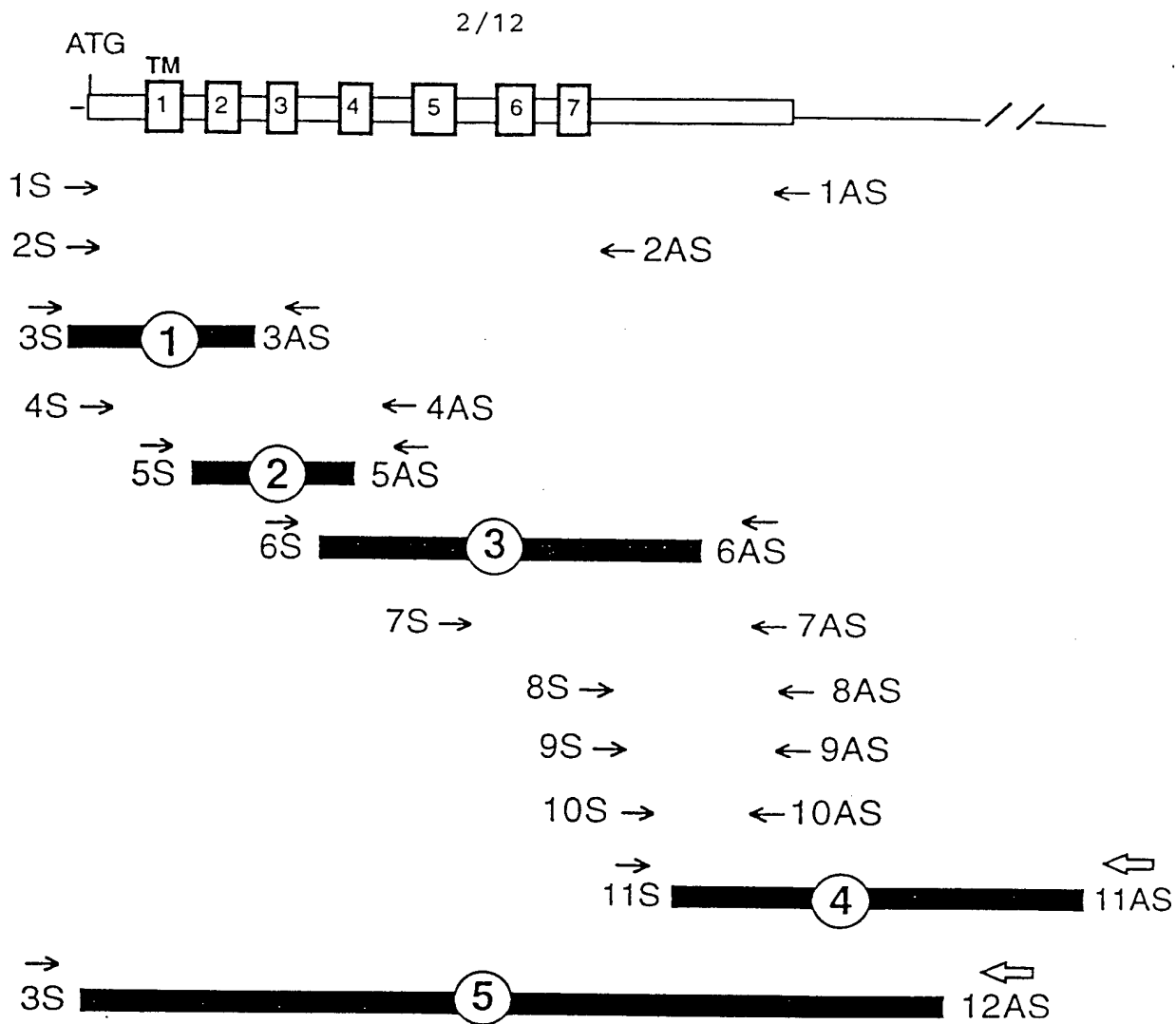


FIGURE 2

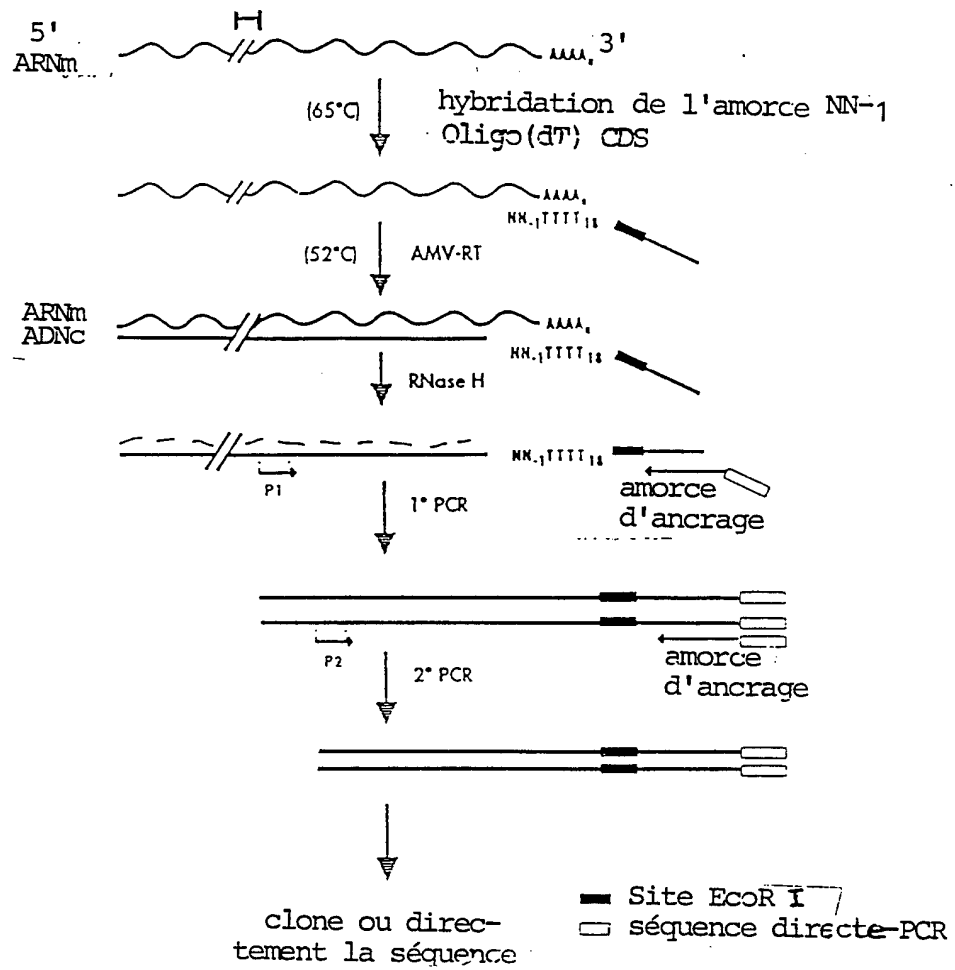


FIGURE 3

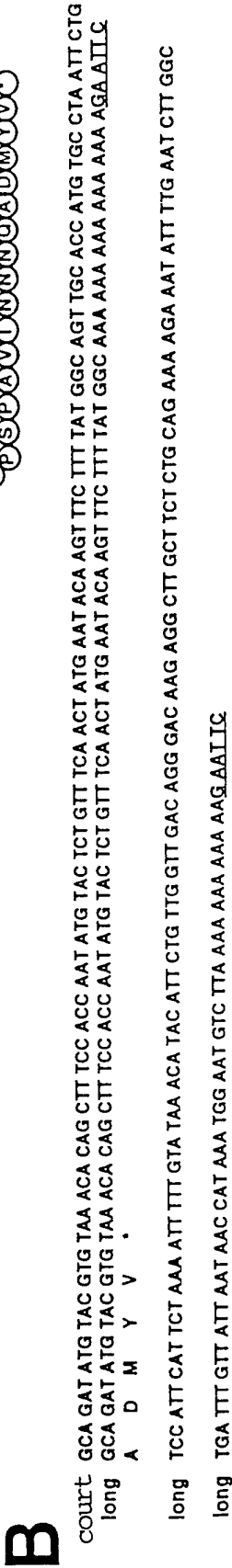
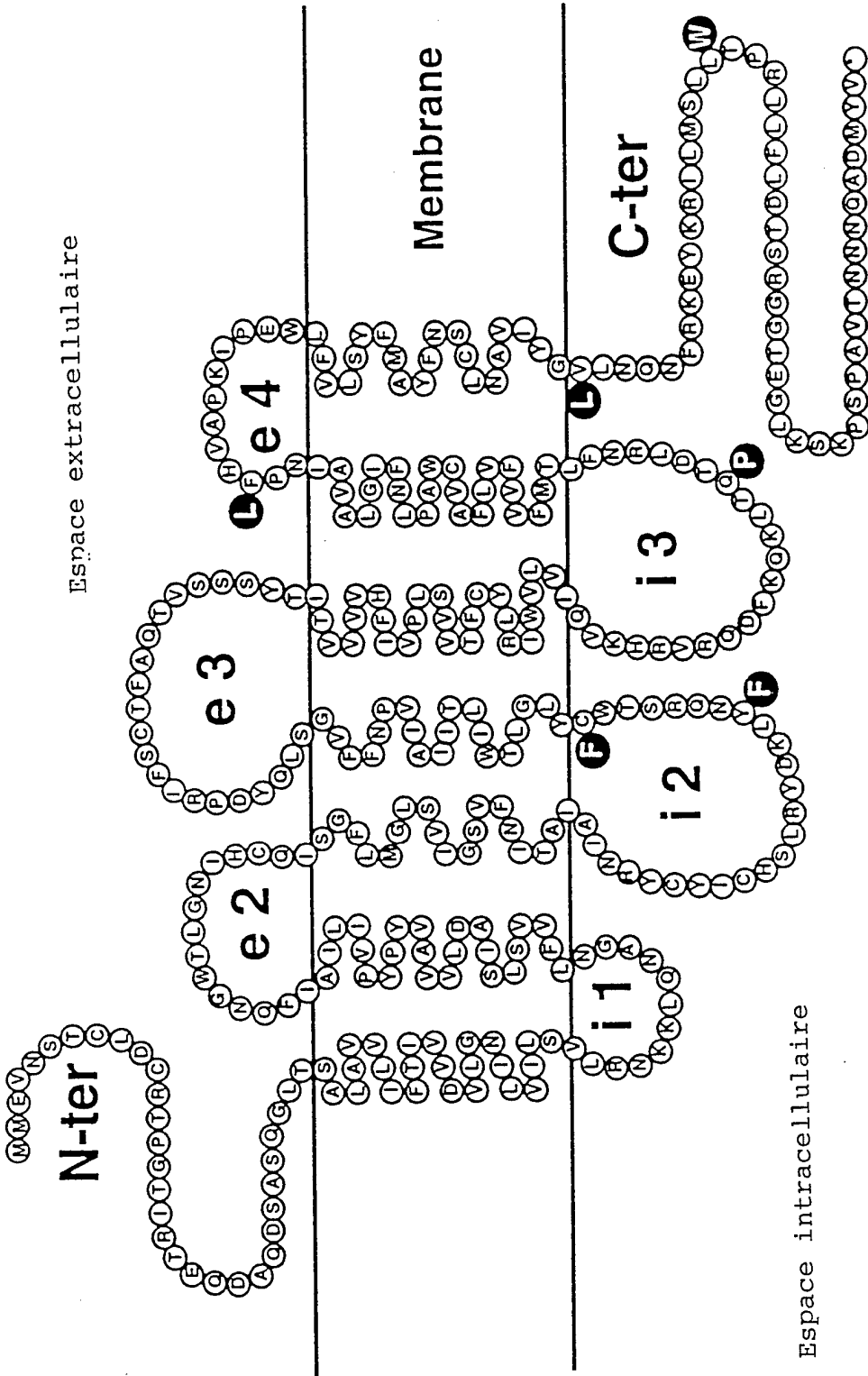


FIGURE 4

5/12

1/1 31/11
 ATG ATG GAG GTG AAT AGC ACT TGC TTG GAT TGC AGG ACA CCT GGT ACC ATA CGA ACA GAG
 M M E V N S T C L D C R T P G T I R T E
 61/21 91/31
 CAG GAT GCA CAG GAC AGC GCA TCT CAG GGA CTC ACC TCT GCC CTG GCG GTG GTT CTT ATA
 Q D A Q D S A S Q G L T S A L A V V L I
 121/41 151/51
 TTC ACC ATT GTT GTG GAT GTC CTG GGC AAT ATA TTG GTC ATT TTG TCT GTC CTG AGG AAC
 F T I V V D V L G N I L V E L S V L R N
 181/61 211/71
 AAG AAG CTG CAG AAT GCT GGA AAT CTC TTT GTT GTC AGT TTG TCT ATT GCC GAT CTG GTT
 K K L Q N A G N L F V V S L S I A D L V
 241/81 271/91
 GTT GCT GTG TAT CCC TAT CCG GTC ATT CTC ATA GCT ATT TTC CAG AAT GGA TGG ACG CTT
 V A V Y P Y P V L L L A I F Q N G W T L
 301/101 331/111
 GGA AAT ATC CAT TGT CAG ATC AGT GGC TTC CTG ATG GGA CTC AGC GTT ATT GGA TCA GTC
 G N I H C Q I S G F L M G L S V I G S V
 361/121 391/131
 TTC AAC ATA ACA GCC ATA GCT ATC AAC AGG TAT TGC TAC ATC TGC CAC AGC CTG AGA TAT
 F N L T A I A I N R Y C Y I C H S L R Y
 421/141 451/151
 GAC AAG CTT TAT AAT CAA AGA AGC ACC TGG TGC TAC CTT GGC CTG ACA TGG ATA CTA ACT
 D K L Y>P N Q R S T W C>P Y L G L T W I L T
 481/161 511/171
 ATA ATT GCA ATC GTG CCA AAC TTT TTT GTT GGA TCA CTA CAG TAT GAC CCC AGG ATT TTT
 I T A I V P N F F V G S L Q Y D P R I F
 541/181 571/191
 TCT TGC ACA TTT GCG CAG ACA GTG AGT TCC TCA TAC ACC ATA ACA GTA GTG GTG GTG CAG
 S C T F A Q T V S S S Y T L T V V V V R
 601/201 631/211
 TTT ATA GTC CCT CTT AGT GTT GTG ACA TTC TGT TAC TTA AGA ATA TGG GTT TTA GTG ATC
 F I V P L S V V T F C Y L R E W V L V L
 661/221 691/231
 CAA GTC AAA CAC AGA GTT AGA CAA GAC TTC AAG CAA AAG TTG ACA CAA ACA GAC TTG AGA
 Q V K H R V R Q D F K Q K L T Q>P T D L R
 721/241 751/251
 AAT TTC TTG ACC ATG TTT GTG GTC TTT GTA CTT TTT GCA GTT TGC TGG GCC CCC TTA AAC
 N F L T M F V V F V L E A V C W A P L N
 781/261 811/271
 TTT ATC GGC CTT GCT GTG GCC ATT AAT CCG TTT CAT GTG GCA CCA AAG ATT CCA GAA TGG
 F I G L A V A L N P F>L H V A P K I P E W
 841/281 871/291
 CTG TTT GTT TTA AGC TAT TTC ATG GCC TAT TTT AAC AGT TGT CTC AAT GCT GTT ATA TAT
 L F V L S Y F M A Y E N S C L N A V L Y
 901/301 931/311
 GGT GTG CTA AAT CAA AAC TTC CGC AAG GAG TAC AAA AGA ATA CTG ATG TCC TTA TTG ACT
 G V>L L N Q N F R K E Y K R I L M S L L>W T
 961/321 991/331
 CCA AGA CTG TTG TTT CTT GAC ACA TCT AGA GGA GGA ACT GAG GGA TTG AAA AGT AAG CCT
 P R L L F L D T S R G G T E G L K S K P
 1001/341 1031/351
 TCG CCA GCT GTA ACC AAC AAC AAT CAA GCA GAT ATG TAC GTG TAA CTA GGA GAA
 S P A V T N N N Q A D M L>Y G>V E>*
 1081/361

FIGURE 5

6/12

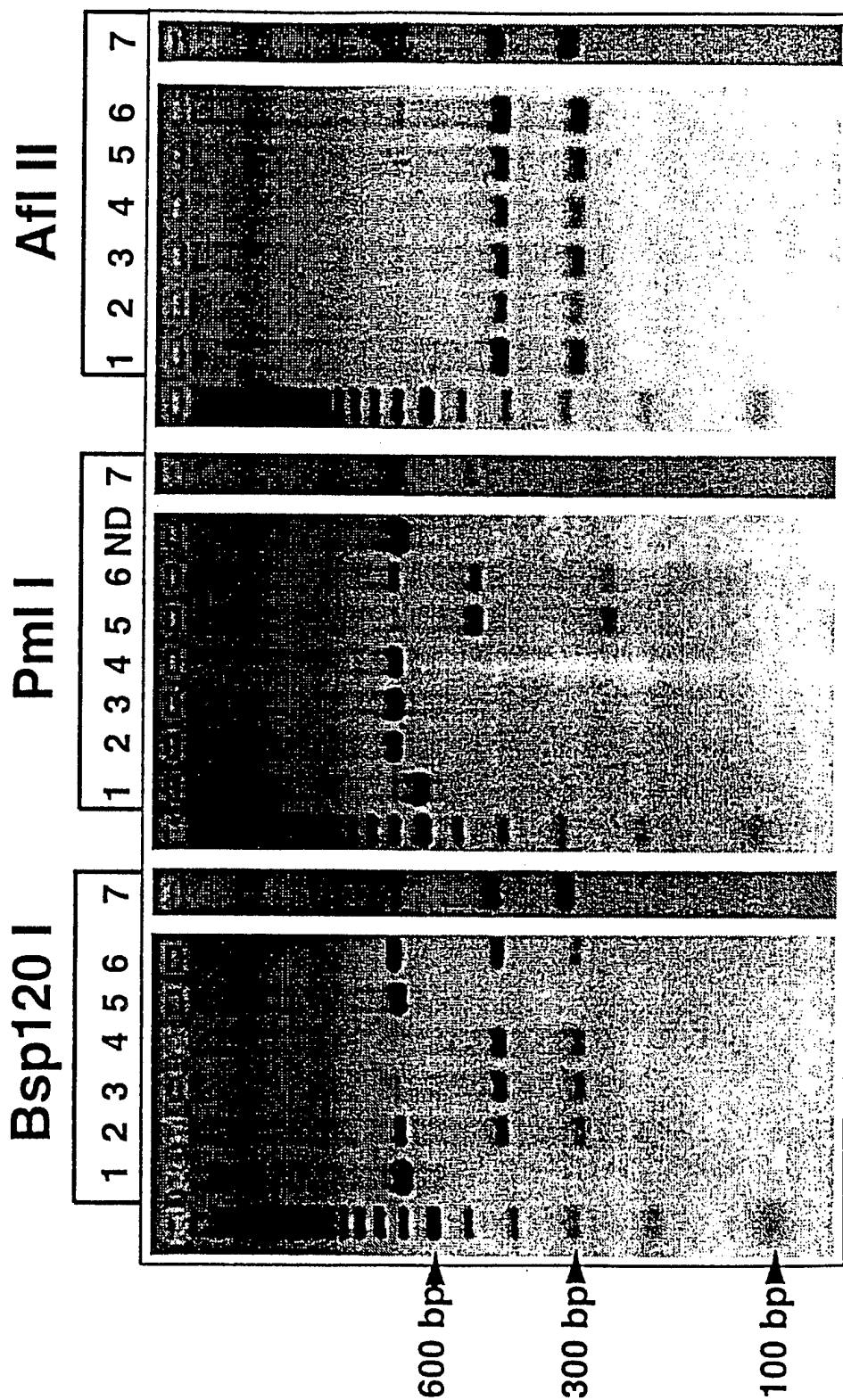


FIGURE 6

7/12

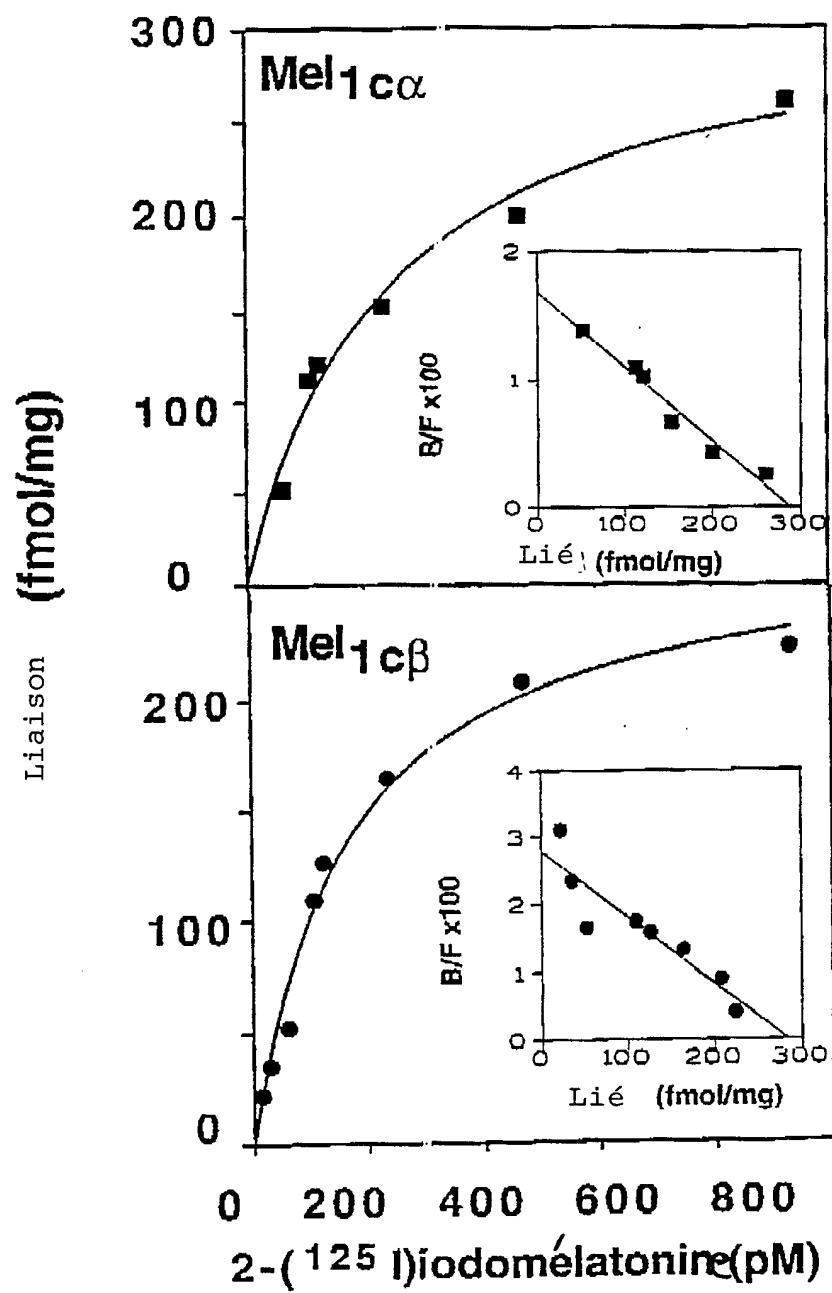


FIGURE 7A

8/12

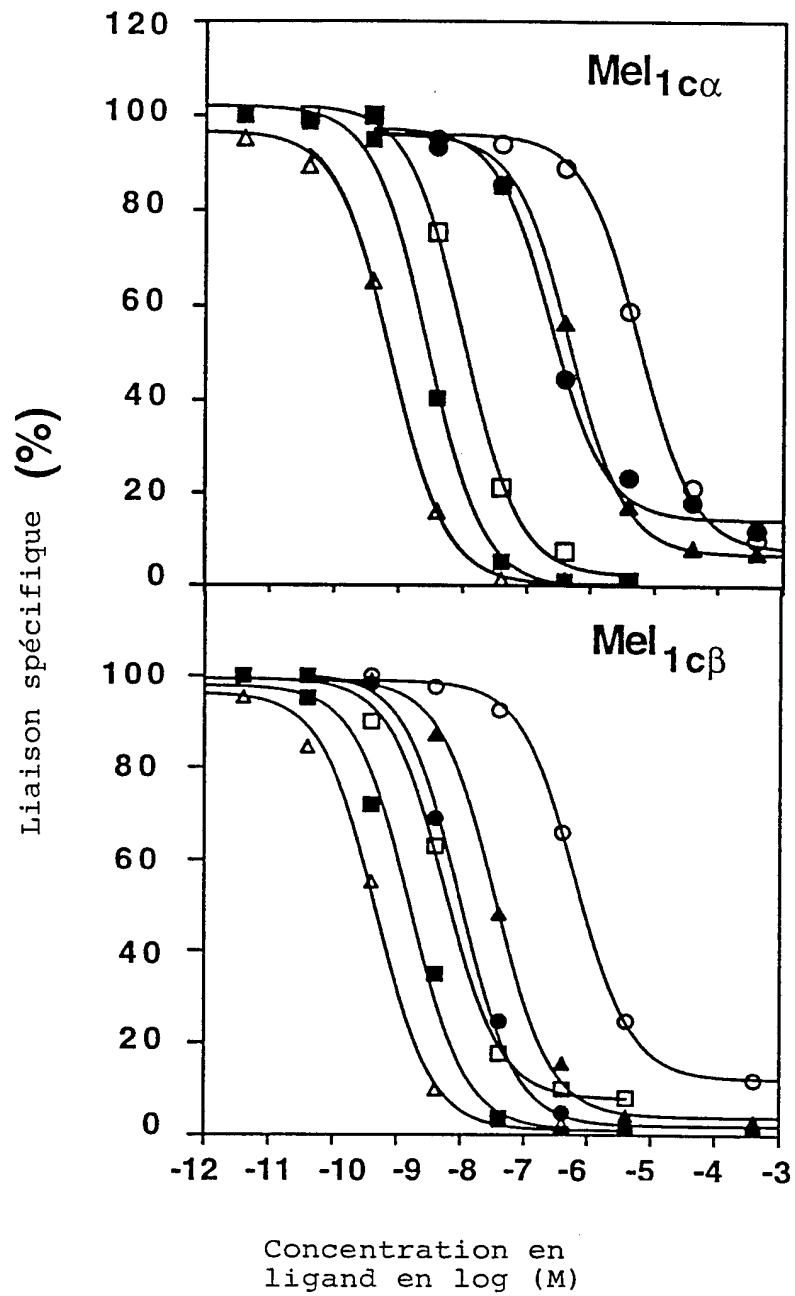
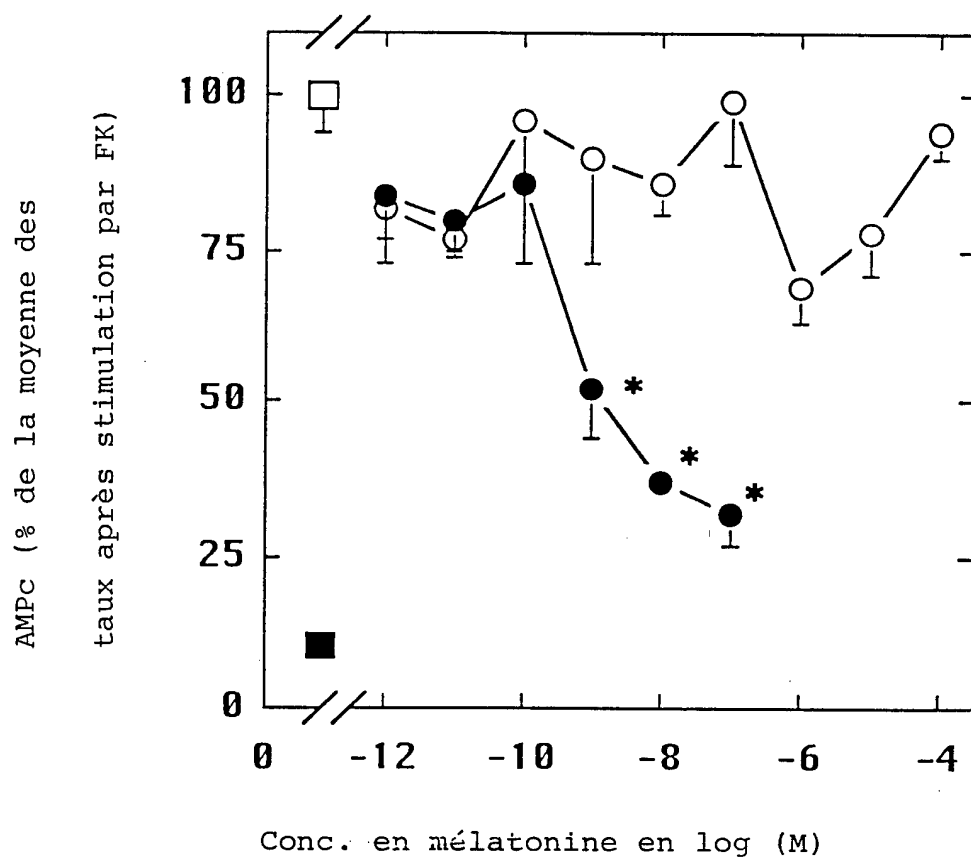


FIGURE 7B

9/12

FIGURE 8

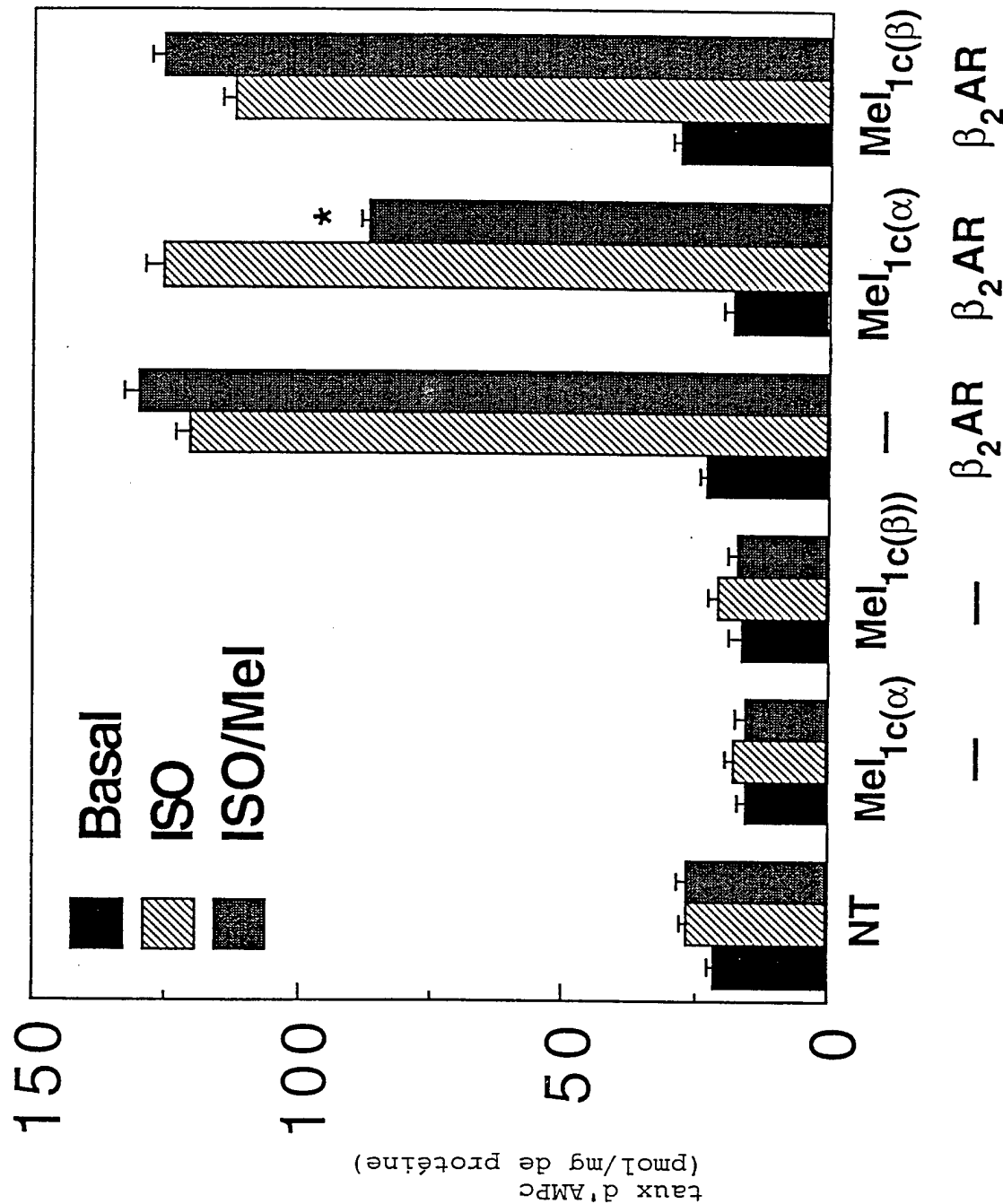


FIGURE 9

11/12

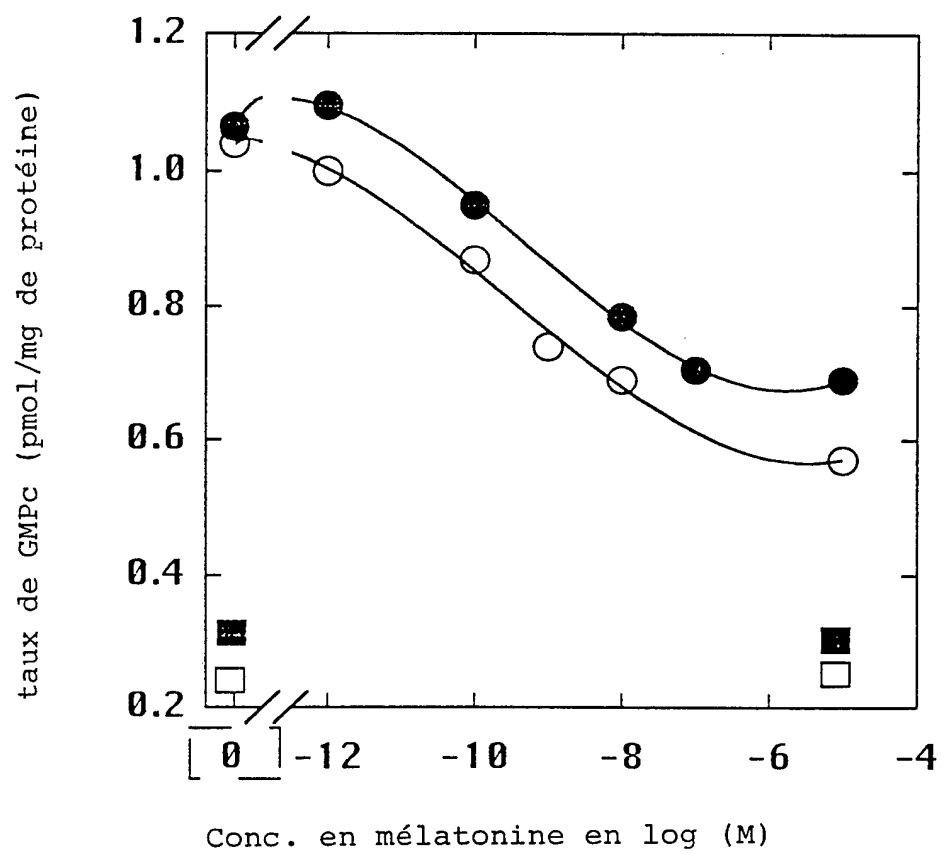


FIGURE 10A

12/12

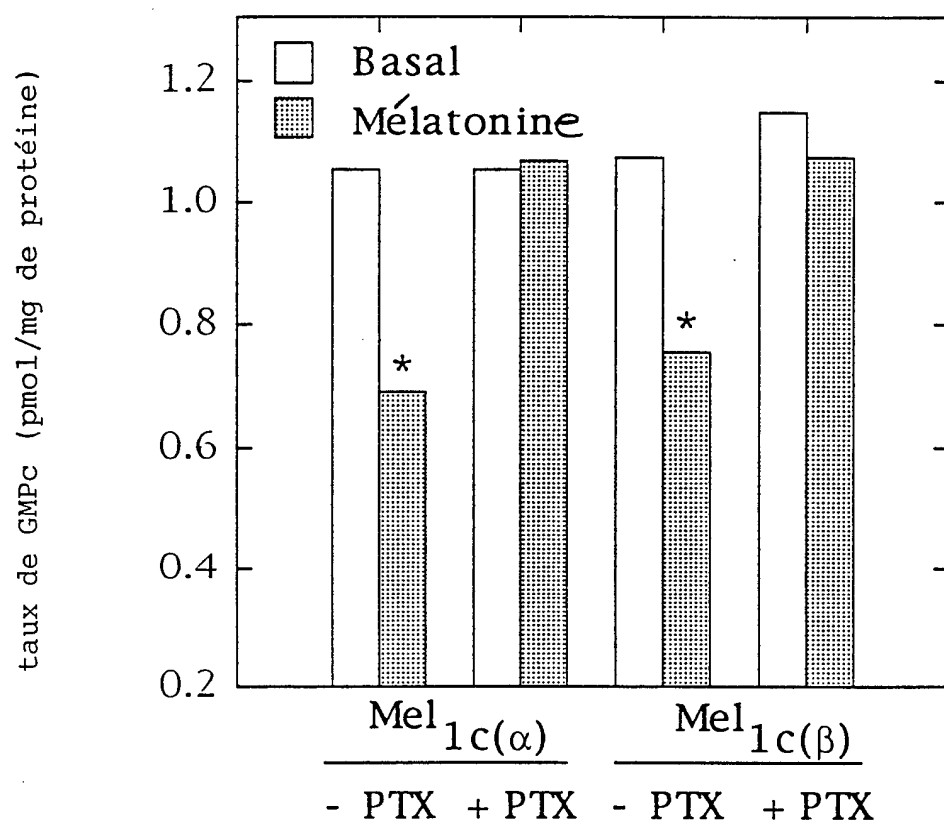


FIGURE 10B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/FR 96/01167

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/12 C07K14/72 C12Q1/68 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 95 35320 A (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL) 28 December 1995 see claims 1-36	1-17
Y	--- PROC NATL ACAD SCI U S A, JUN 21 1994, 91 (13) P6133-7, UNITED STATES, XP002004069 EBISAWA T ET AL: "Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from Xenopus dermal melanophores." cited in the application see the whole document	1-17
Y	--- TRENDS PHARMACOL SCI, FEB 1995, 16 (2) P50-6, ENGLAND, XP002004070 DUBOCOVICH ML: "Melatonin receptors: are there multiple subtypes?" see the whole document --- -/--	1-17

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 November 1996

Date of mailing of the international search report

06.12.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Nauche, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatic Application No

PCT/FR 96/01167

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NEURON, NOV 1994, 13 (5) P1177-85, UNITED STATES, XP000572113 REPPERT SM ET AL: "Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses." see the whole document ---	1-17
A	GENOMICS, MAY 20 1995, 27 (2) P355-7, UNITED STATES, XP000572116 SLAUGENHAUPT SA ET AL: "Mapping of the gene for the Mella-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a)." -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. nation on patent family members

Internatic	Application No
------------	----------------

PCT/FR 96/01167

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9535320	28-12-95	AU-A- 2702395	15-01-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 96/01167

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/12 C07K14/72 C12Q1/68 C12N5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	WO 95 35320 A (MASSACHUSETTS GEN HOSPITAL) 28 Décembre 1995 voir revendications 1-36 ---	1-17
Y	PROC NATL ACAD SCI U S A, JUN 21 1994, 91 (13) P6133-7, UNITED STATES, XP002004069 EBISAWA T ET AL: "Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from Xenopus dermal melanophores." cité dans la demande voir le document en entier ---	1-17
Y	TRENDS PHARMACOL SCI, FEB 1995, 16 (2) P50-6, ENGLAND, XP002004070 DUBOCOVICH ML: "Melatonin receptors: are there multiple subtypes?" voir le document en entier ---	1-17
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 Novembre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06.12.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nauche, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 96/01167

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	NEURON, NOV 1994, 13 (5) P1177-85, UNITED STATES, XP000572113 REPPERT SM ET AL: "Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses." voir le document en entier ---	1-17
A	GENOMICS, MAY 20 1995, 27 (2) P355-7, UNITED STATES, XP000572116 SLAUGENHAUPT SA ET AL: "Mapping of the gene for the Mella-melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnrla)." -----	

Renseignements relatifs aux mesures de familles de brevets

PCT/FR 96/01167

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)